

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LES CHAMPIGNONS FORESTIERS DES FORÊTS QUÉBÉCOISES :
CARACTÉRISER LEUR DIVERSITÉ ET COMPRENDRE LEUR DISTRIBUTION

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
GENEVIEVE LAPERRIERE

JUIN 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

Direction de recherche :

Hugo Germain, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche

Jean-Marc Moncalvo, Ph. D. Royal Ontario Museum
Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation de la thèse :

Hugo Germain, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche

Jean-Marc Moncalvo, Ph. D. Royal Ontario Museum
Codirecteur de recherche

Guy Samson, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Président de jury

François Guillemette, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Évaluateur

Jean Bérubé, Ph. D. Centre de Foresterie des Laurentides
Évaluateur externe

Thèse soutenue le 8 juin 2020.

*Je dédie cette thèse à deux êtres qui me sont chers :
à mon très cher mari Alex dont j'ai trouvé en toi
l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de
mon chemin ainsi qu'à mon amour poilu.*

REMERCIEMENTS

Je n'aurai pu finir ce doctorat sans l'appui de personnes précieuses qui ont fait ce bout de chemin avec moi et qui m'ont encouragée, supportée et écoutée tout au long de cette longue épreuve qui n'a pas toujours été de tout repos. J'en suis sortie grandie, plus confiante et forte, mais j'ai aussi gagné des amitiés hors du commun et une seconde famille qui fera à tout jamais partie de ma vie.

On dit de l'amitié, qu'il s'agit d'un sentiment incontournable et qu'elle est plus forte que l'amour, qu'elle sait être lucide quand il le faut et aveugle quand elle doit. Mes premiers remerciements vont à deux personnes qui me sont chères et qui sont devenues plus que des amies, mais des sœurs. Merci à Narimane Fradj et Claire Letanneur pour votre amitié et votre soutien. Narimane, ma compagne de bouffe, j'ai adoré nos discussions interminables autour d'une pizza de chez Botan et nos nombreux fous rires. Tu es une femme formidable qui apporte de la joie partout où elle passe et n'oublie pas, jamais tu ne me déranges. Claire Letanneur, tu es une personne dévouée qui donnerait la lune aux gens qu'elle aime pour les rendre heureux. C'est pour cette raison que je voulais t'avoir à mes côtés dans le moment le plus important de ma vie : mon mariage.

Pour des raisons qui ne s'expliquent pas, certaines personnes vont croiser notre chemin et faire une différence dans notre cheminement. Un énorme merci à Mélodie B. Plourde pour ta confiance et ta patience. Avec le temps tu es devenue une amie précieuse qui m'a apporté beaucoup de sagesse. J'ai beaucoup appris grâce à toi et tu es un modèle à mes yeux. J'espère devenir une femme aussi accomplie que toi. Je veux aussi remercier Roxanne Giguère-Tremblay, ma partenaire de projet, ma compagne de champignons, mais aussi ma complice pour « chialer ». Nous avons deux personnalités très différentes, mais au final on se complète bien. Merci aussi à Guy Samson de m'avoir permis d'assister ses laboratoires et de m'avoir donné la chance d'enseigner l'espace d'une session. J'ai découvert une nouvelle passion et

j'ai grandement amélioré ma confiance en moi. Merci aussi à Nathalie Godbout, dont nos discussions sur la vie vont me manquer. Tu as été à mes yeux plus qu'une collègue de travail, mais une confidente et amie.

N'oublions pas qu'un doctorat n'aurait pas lieu d'être sans l'appui et l'encouragement de personnes qui croient en notre potentiel et nos capacités. C'est ainsi que je n'aurais jamais assez de mots pour remercier mon directeur de recherche Hugo Germain. Nous n'avons pas toujours été d'accord sur tout et nous avons eu nos différents, mais tu as su trouver les bons mots aux bons moments, m'encourager et me rassurer dans les temps plus difficiles. Tu es la personne la moins subtile que je connaisse, mais qui possède aussi un positivisme sans faille. Aussi, un énorme merci au professeur Vincent Maire qui s'est impliqué dans le projet et qui y a beaucoup contribué notamment par sa participation à l'échantillonnage dans le fond du Québec à se faire manger par les moustiques. Finalement, j'aimerais aussi remercier le professeur Pierre-Luc Chagnon pour son aide dans un moment où j'en ai eu le plus besoin. Sans me connaître, tu m'as offert ton support sans rien demander en retour tout simplement pour aider et tu as fait une énorme différence dans la finalité de mon doctorat. Un geste que je ne pourrais jamais oublier.

Mon doctorat n'aurait pas non plus existé si une personne bien précise n'avait pas cru et démontré de l'intérêt à ce projet. C'est ainsi que je tiens à remercier Danny Bisson, un collaborateur exemplaire qui n'a jamais cessé de croire en l'importance du projet et aux contributions qu'il pouvait apporter. Tu as toujours été disponible pour nous aider et faire avancer le projet à chaque étape cruciale. Ton calme, ta bonne humeur et ta gentillesse naturelle font de toi un être d'exception et cela aura été un honneur de collaborer avec toi et j'espère que cela ne s'arrêtera pas.

En terminant, je veux exprimer ma gratitude à tous les étudiants qui m'ont aidé pour l'échantillonnage terrain et les manipulations en laboratoire et je remercie tout spécialement Alexandre Brisson et Mathias Bisailon pour leur aide dans les analyses de

sols et les extractions ainsi que Joëlle Rancourt, Isabelle Gosselin, Perrine Juillion et Ingrid Sanchez pour leur aide en Abitibi, s'était de beaux moments.

Merci aussi aux nombreux organismes (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et Technologies, Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels du Québec et le Centre SÈVE) qui, par l'octroi de bourses, ont soutenu financièrement le projet ainsi que mes études supérieures.

RÉSUMÉ

Les champignons sont des organismes vivants fascinants, que l'on retrouve dans tous les types d'habitats terrestres ou aquatiques, sur tous les continents et même à haute altitude. Leur richesse est variable en fonction des habitats et elle est modulée par des conditions environnementales telles que le climat, le type de sol ou la présence de certaines espèces végétales. Du fait de leur diversité, de leur mode de vie et leur fonction, les champignons vont jouer des rôles importants dans les écosystèmes en intervenant, notamment, dans la décomposition de la matière organique, le cycle des nutriments et dans la formation de symbioses. Pour les forêts boréales et tempérées des changements dans les compositions fongiques, peuvent affecter la performance et la fonctionnalité de ces écosystèmes. Certaines espèces fongiques sont aussi une source de revenus et possèdent un potentiel commercial important parce qu'ils sont comestibles ou par la production de molécules d'intérêts. Malheureusement, un des freins majeurs pour la conservation et le développement de la ressource fongique est le manque de connaissance sur leur diversité. Dans le cadre de cette thèse, trois objectifs ont été ciblés afin d'augmenter le niveau de connaissance en mycologie et valoriser les champignons forestiers d'intérêts.

Dans le cadre du premier objectif de cette thèse, la diversité fongique globale sur une partie du territoire québécois a été estimée en plus de l'identification des variables environnementales influençant la richesse et la composition fongique. La diversité fongique a été estimée par le séquençage de l'ADN environnemental extrait d'échantillons de sols récoltés sur plus de 200 peuplements différents qui ont été caractérisés au niveau de plusieurs variables abiotiques (p. ex. pH du sol, recouvrement, épaisseur de la litière et humus). Les résultats obtenus ont démontré que l'âge du peuplement ainsi que le couvert en mousse étaient de forts prédicteurs de la richesse fongique. La composition fongique a aussi été analysée entre les peuplements et le pH du sol, les précipitations moyennes pendant la saison de croissance et l'âge du peuplement ont été identifiés comme des variables qui modulent les compositions fongiques. De plus, une analyse régionale des communautés fongiques a révélé un fort taux de remplacement des espèces. Ces résultats ont permis d'avoir une vue d'ensemble de la diversité fongique à travers la forêt boréale et tempérée du Québec.

Le deuxième objectif consistait à identifier de forts prédicteurs de présence pour des espèces fongiques d'intérêts et de cartographier leurs sites potentiels de présence. Les données de séquençage sur l'ADN environnemental d'échantillons de sols ont permis d'identifier des espèces fongiques d'intérêts. Nous avons utilisé des modèles linéaires généralisés (GLMs) pour prédire la distribution des espèces fongiques d'intérêts et appliqué les résultats sous forme de carte. Dans cette étude, *Amanita muscaria* a été utilisée comme exemple. Au total, 131 072 combinaisons possibles de modèles ont été générées et la sélection du meilleur modèle (Information Criteria) comportait le pH du sol, les précipitations moyennes durant la saison de croissance et le couvert en mousse. Les résultats du modèle ont été appliqués sur des données

écoforestières à grande échelle pour générer des cartes de potentiel de présence à travers les régions de l'Abitibi et la Mauricie. Ces cartes serviront dans l'avenir comme outil afin de cibler les sites potentiels de cueillette.

Le dernier objectif de cette thèse a permis l'étude d'un de nos champignons forestiers comestibles, très recherché sur le marché commercial, le champignon crabe (complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*). Le champignon crabe résulte d'une infection par un ascomycète *Hypomyces lactifluorum* sur la russule à pied court (*Russula brevipes*). Des tissus, dans différents endroits du sporocarbe, ont été récoltés afin d'en extraire l'ADN et d'investiguer, au moyen du PCR en temps réel, la distribution des deux espèces à différents stades d'infection. Les résultats obtenus ont été des plus intéressants puisqu'ils ont démontré que les deux espèces sont présentes partout dans le sporocarbe, mais que l'ADN de la russule à pied court décline jusqu'à presque totalement disparaître dans les stades plus avancés du champignon. Des analyses de métabolites ont aussi révélé une forte présence de terpènes chez la russule à pied court qui sont absents chez le champignon crabe qui est plus abondant en lipides. Des indices qui pourraient expliquer le changement de saveur.

Brièvement, les objectifs ont obtenu des résultats prometteurs. Ils sont présentement à différents stades de publication et permettront sans doute d'améliorer les notions scientifiques et les outils de conservation de la diversité fongique du territoire, mais aussi à développer le marché des champignons forestiers d'intérêts par l'élaboration d'outils et de connaissances qui permettront de mieux les localiser et de cartographier leur distribution.

Mots-clés : Diversité fongique, Champignon crabe, Métabarcoding, Modèles de répartition des espèces, Cartographie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ.....	vii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les champignons	1
1.2 Groupes fonctionnels des champignons	3
1.2.1 Les saprotrophes	4
1.2.2 Les symbiotrophes	4
1.2.3 Les pathotrophes	5
1.3 Diversité et abondance des champignons.....	6
1.4 Fonction des champignons dans les écosystèmes des forêts boréales et tempérées	8
1.5 Les champignons forestiers comestibles	11
1.6 Importance des champignons forestiers comestibles au Québec.....	14
1.7 Problématiques et objectifs de recherche	17
1.7.1 Estimer la diversité fongique globale sur une partie du territoire québécois et identifier des variables environnementales influençant la richesse et les communautés fongiques	18
1.7.2 Identifier de forts prédicteurs de présence chez des espèces fongiques d'intérêts et cartographier les sites potentiels de présence	23
1.7.3 Étudier la biologie d'une espèce comestible à fort potentiel commercial et unique à l'Amérique du Nord, le champignon crabe (complexe <i>Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes</i>).....	27
CHAPITRE II	
ESTIMATION OF FUNGAL DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF MAJOR ABIOTIC DRIVERS INFLUENCING FUNGAL RICHNESS AND COMMUNITIES IN NORTHERN TEMPERATE AND BOREAL QUEBEC FORESTS	28
2.1 Contributions des auteurs	28

2.2	Résumé de l'article (français).....	29
2.3	Article complet (anglais) : Estimation of fungal diversity and identification of major abiotic drivers influencing fungal richness and communities in northern temperate and boreal Quebec forests	31
	Abstract.....	31
	Introduction	32
	Materials and Methods	33
	Study sites and soil sampling.....	33
	Clustering of sites into climatic domains.....	35
	Site characterization.....	35
	Soil analysis	36
	Soil DNA extraction, amplification and sequencing	36
	Bioinformatic analysis	37
	Statistical analysis.....	38
	Results	39
	Taxonomy diversity	39
	Fungal richness	40
	Fungal community composition	43
	Discussion.....	48
	Fungal diversity in temperate and boreal Quebec forest	48
	Abiotic drivers of fungal richness.....	49
	Drivers of fungal community composition.....	52
	Conclusions	54
	References	57
CHAPITRE III		
COMBINING NEXT GENERATION SEQUENCING DATA AND ABIOTIC VARIABLES FOR MODELING AND PREDICT FUNGAL SPECIES DISTRIBUTION		67
3.1	Contributions des auteurs	67
3.2	Résumé de l'article (français).....	68
3.3	Article complet (anglais): Combining next generation sequencing data and abiotic variables for modeling and predict fungal species distribution	70
	Abstract.....	70

Introduction	71
Materials and methods.....	72
Sites selection, soil sampling and characterization.....	72
Soil analysis, DNA extraction, amplification and sequencing	73
Statistical analyses	74
Creation of maps for potential distribution.....	75
Results	75
Results from GLMs	75
Maps of potential distribution.....	77
Conclusions	79
References	80
Supplementary materials	84
CHAPITRE IV	
DNA DISTRIBUTION PATTERN AND METABOLITE PROFILE OF WILD EDIBLE LOBSTER MUSHROOM (<i>HYPOMYCES LACTIFLUORUM</i>/<i>RUSSULA BREVIPES</i>).....	86
4.1 Contributions des auteurs	86
4.2 Résumé de l'article (français).....	87
4.3 Article complet (anglais) : DNA distribution pattern and metabolite profile of wild edible lobster mushroom (<i>Hypomyces lactifluorum</i> / <i>Russula brevipes</i>).	88
Abstract.....	88
Introduction	88
Materials and methods.....	90
Mushroom collection and tissue sampling.....	90
DNA extraction.....	91
PCR amplification and sequencing.....	91
Cloning of <i>H. lactifluorum</i> ITS.....	92
Design and specificity testing of primers	92
qPCR	93
Metabolites analysis.....	94
Results	95
<i>Hypomyces lactifluorum</i> and <i>R. brevipes</i> primers produce specific amplicons.....	95

Colonization of <i>R. brevipes</i> by <i>H. lactifluorum</i> in lobster mushroom sporocarp.....	96
Proportion of <i>H. lactifluorum</i> and <i>R. brevipes</i> in different infection stages of the lobster mushroom sporocarp.....	97
Metabolites analysis of <i>R. brevipes</i> and lobster mushroom sporocarps .	98
Discussion.....	100
Difference in metabolite contents between <i>R. brevipes</i> and lobster mushroom	102
Conclusions	104
Acknowledgements	104
References	105
CHAPITRE V	
DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	108
5.1 La biodiversité via le métabarcoding.....	108
5.2 Modèles de répartition des espèces	111
5.3 Conclusions	113
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Représentation de différents mycéliums de champignons.....	2
1.2	Représentation de différents sporocarpes de champignons	2
1.3	Interpolation de la richesse fongique totale à travers le globe terrestre.....	7
1.4	Représentation de champignons forestiers comestibles les plus recherchés sur le marché québécois	15
1.5	Schématisation de la région ITS (Internal Transcribed Spacers) et ses amorces	21
1.6	Schéma représentant les étapes principales dans un projet de metabarcoding chez les champignons.....	22

Tableau

1.1	Liste des espèces fongiques et leur nombre de séquences ITS présentes dans notre base de données moléculaire locale.....	25
-----	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	Acide désoxyribonucléique environnemental
COI	Cytochrome <i>c</i> oxydase I
ECM	Ectomycorhize
iBOLD	BOLD nucleic database
ITS	Internal Transcribed Spacers
LSU	Large subunit
matK	Gène de la maturase K
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
rbcL	Grande sous-unité de la ribulose
SDM	Species distribution modeling
SSU	Small subunit
UNITE	Database for molecular identification of fungi
VAM	Ectomycorhize à vésicules et arbuscules

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les champignons

Les champignons sont des organismes vivants fascinants, mais très méconnus. On les retrouve pourtant dans tous les types d'habitats terrestres ou aquatiques, sur tous les continents et même à haute altitude (Tedersoo, Bahram et al. 2014) . Ces organismes ont longtemps été regroupés dans le règne des plantes, malgré le fait qu'ils possèdent des caractéristiques anatomiques et physiologiques différentes des végétaux. Les champignons se définissent par leur structure cellulaire composée de chitine et non de cellulose et l'absence de chloroplastes. Ce sont aussi des organismes hétérotrophes qui se nourrissent en absorbant les nutriments. Aujourd'hui ils constituent un règne unique, celui des *Eumycètes*, *Fungi* ou champignons. Le règne fongique est constitué de huit groupes majeurs (phylum) : *Microsporidia*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* et *Basidiomycota* (Petersen 2012). Leur structure anatomique est généralement composée d'une partie végétative appelée mycélium qui est constituée d'un réseau dense d'hyphes qui colonise, tant que les conditions sont favorables, différents substrats comme le sol, la litière et les débris forestiers, le bois mort ou vivant et les tissus animaux ou végétaux (Figure 1.1). Périodiquement, les champignons vont produire des organes de reproduction qui sont invisibles à l'œil chez la plupart des espèces fongiques. Chez les macromycètes, ces organes sont appelés sporocarpe et sont caractérisés par différentes formes et grosseurs (Figure 1.2). Les organes de reproduction permettent aux champignons de produire, d'entreposer et de propager des spores via une reproduction asexuée ou sexuée. De façon générale, la reproduction asexuée n'implique aucun échange génétique et les hyphes peuvent produire des spores à l'aide de cellules spécialisées comme les conidies. La reproduction sexuée, au contraire, nécessite un

échange du bagage génétique entre deux hyphes du même individu (reproduction homothallique) ou entre deux individus différents (reproduction hétérothallique).

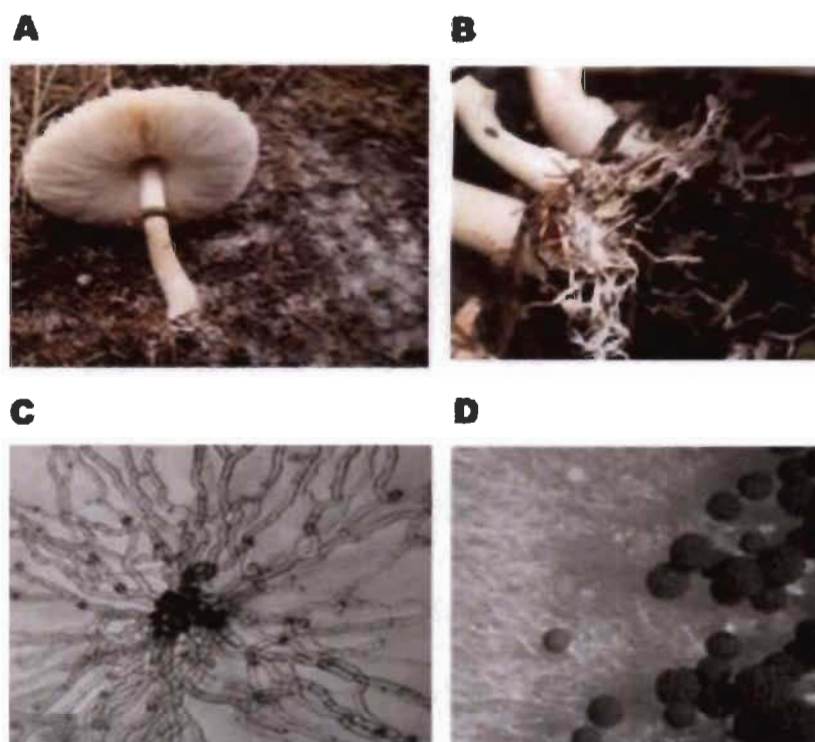


Figure 1.1 Représentation de différents mycéliums de champignons.
 (A) Étendu d'un mycélium couvrant le sol (B) Hyphes au pied d'un sporocarpe (C) Hyphes et spores sur boîte de Petri (D) Hyphes (structure blanche et filamenteuse) près de conidiophores chez *Aspergillus niger*.
 Source : (A) (B) Fernand Miron et Anita Royer (2015). Culture des champignons sous couvert forestier. Montréal, BouquinPlus, p. 19. (C)(D) Jens H Petersen (2012). The kingdom of fungi. New Jersey, Princeton University Press, p. 12, 28.

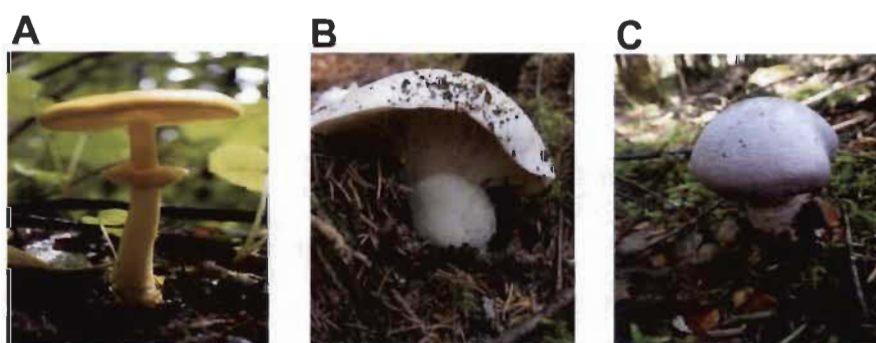


Figure 1.2 Représentation de différents sporocarpes de champignons.
 (A) *Amanita muscaria* (B) *Catathelasma ventricosum* (C) *Cortinarius violaceus*. Source : photos personnelles Genevieve Laperriere.

1.2 Groupes fonctionnels des champignons

Les communautés fongiques sont composées d'une grande diversité d'espèces ayant des modes de vie et des fonctions différentes dans les écosystèmes. En fonction de ces critères, les champignons sont classés dans trois grands niveaux trophiques : les saprotrophes, les symbiotrophes ainsi que les pathotrophes. Tous ces niveaux comportent différents groupes fonctionnels (Nguyen, Song et al. 2016). Les groupes fonctionnels peuvent généralement être identifiés en connaissant le genre auquel le champignon appartient (Nguyen, Song et al. 2016). Le genre *Suillus*, par exemple, est constitué seulement d'individus ectomycorhiziens tandis que chez le genre *Puccinia*, tous sont des pathogènes de plantes (Cummins et Hiratsuka 2003, Tedersoo et Smith 2013). Malheureusement, pour d'autres espèces, celles-ci peuvent changer de niveau trophique au cours de leur cycle de vie ou ont la capacité d'être dans plusieurs niveaux à la fois (Cromack Jr et Caldwell 1992, Knapp, Kovács et al. 2015, Nguyen, Song et al. 2016). Dû à la difficulté d'attribuer un niveau trophique ou un groupe fonctionnel à certain groupe, l'utilisation d'isotopes stables est un moyen utilisé pour déterminer si un champignon est mycorhizien ou saprotrophe. Les champignons mycorhiziens seraient plus enrichis en azote et pauvre en carbone comparativement aux saprotrophes (Hobbie, Weber et al. 2001). Les nouvelles avancées en technologie moléculaire permettent aussi d'attribuer des espèces fongiques à un groupe fonctionnel grâce au séquençage de l'ADN et via les bases de données publiques (Nguyen, Song et al. 2016). Les chercheurs sont toutefois limités puisque pour plusieurs groupes, l'information est incomplète ou inexistante.

Les fonctions qu'occupent les champignons dans un écosystème apportent aux écologistes des informations différentes sur les communautés fongiques et permettent de cibler certains groupes. Cela permet d'obtenir des informations sur la disponibilité des niches écologiques, les stratégies trophiques et les groupes fonctionnels dominants qui peuvent donner des indications sur le fonctionnement, l'état et l'évolution d'un écosystème.

1.2.1 Les saprotrophes

Les saprotrophes colonisent, via le mycélium, du substrat organique vivant ou mort de différentes tailles et de formes (litière forestière, bois, fumier). Selon les espèces, les champignons saprotrophes colonisent et dégradent des substrats spécifiques. On retrouve des saprotrophes du bois (mort ou vivant), du sol (litière forestière, prairie), des feuilles ou encore de la matière organique riche (fumier) (Bell 1983, Gilbertson et Ryvarden 1987, Rosling, Cox et al. 2011, Tedersoo, Bahram et al. 2014). Les genres *Pleurotus* et *Polyporus* sont des saprotrophes du bois bien connus tandis que les psalliotes du genre *Agaricus* poussent sur des sols riches en matière organique (McNeil 2006, Després 2012). Les saprotrophes décomposent de la matière organique en grande partie constituée de débris de lignine, cellulose, pectine et chitine provenant de la paroi cellulaire des organismes (plantes, champignons, insectes) (Baldrian 2008). Pour dégrader ces polymères, notamment la lignine, des enzymes extracellulaires de la classe des oxydoréductases sont sécrétées par le mycélium et les types d'enzymes produites, peuvent être différentes selon les espèces fongiques (Hofrichter 2002, Valášková, Šnajdr et al. 2007).

1.2.2 Les symbiotrophes

Un autre grand groupe trophique chez les champignons est celui des symbiotrophes qui consistent à former des symbioses avec d'autres organismes. Lorsque le champignon, via les hyphes, forme des associations avec les racines des espèces végétales, ce type de symbiose est appelé mycorhize. La principale fonction des mycorhizes est le transfert des ressources du sol vers l'hôte. Elles permettent aussi l'augmentation de l'apport en eau et en nutriment notamment du phosphore et de l'azote, mais elles permettent aussi à la plante de se développer et de se protéger contre les pathogènes (Jung, Martinez-Medina et al. 2012). D'ailleurs, les champignons mycorhiziens sont souvent utilisés en agriculture et plus particulièrement, les individus appartenant au phylum des *Glomeromycota* (Brundrett, Bougher et al. 1996, Priyadharsini et Muthukumar 2016, Verzeaux, Hirel et al. 2017). Les associations mycorhiziennes sont définies et classées par des critères anatomiques qui sont régulés

par la plante hôte. Les principales catégories sont les mycorhizes arbusculaires ou vasculaires (VAM) et les ectomycorhizes (ECM) (Brundrett 2004). Les hyphes, dans le cas de mycorhizes arbusculaires ou vasculaires, pénètrent les cellules racinaires et forment des vésicules ou des arbuscules à l'intérieur de la cellule. C'est le contraire chez les ectomycorhizes, où les hyphes ne font qu'entourer les cellules racinaires (Després 2012). Les symbiotrophes ne sont pas seulement des champignons mycorhiziens, mais comportent aussi d'autres relations symbiotiques comme les lichens, qui sont une association algue-champignon, et les endophytes. Les endophytes sont des micro-organismes qui vivent en symbiose avec une plante sans former de mycorhizes. Les champignons sont les endophytes les plus étudiés, mais elles incluent aussi les bactéries, les algues et d'autres plantes (Stone, Bacon et al. 2000). Les plantes hôtes bénéficient de cette association via un gain de leur résistance aux herbivores, aux stress et aux pathogènes (Saikkonen, Faeth et al. 1998).

1.2.3 Les pathotrophes

Le dernier grand groupe trophique est celui des champignons pathotrophes. Ces derniers peuvent engendrer des lésions ou causer des maladies chez les organismes vivants et provoquer de terribles dommages en agriculture et en foresterie. Certains de ces champignons sont des pathogènes de plantes, d'animaux ou des parasites d'autres champignons (Nguyen, Song et al. 2016). Les pathogènes de plantes sont nombreux, mais parmi le top 10 on y retrouve, au premier rang, les genres *Magnaporthe*, *Botrytis* et *Puccinia*. Tous ces groupes contiennent des espèces qui peuvent s'attaquer aux plantes de culture comme le riz, les tomates et les céréales (Dean, Van Kan et al. 2012). Chez les humains et les animaux, les champignons pathogènes sont pour la plupart microscopiques et peuvent provoquer des dermatoses, des maladies respiratoires ou des allergies (Brown, Denning et al. 2012). Les relations de parasitisme sont aussi présentes chez les champignons et ils peuvent s'attaquer aux plantes, aux insectes, aux mammifères ou à d'autres champignons. Certaines associations mycorhiziennes pourraient même être considérées comme du parasitisme lorsque le coût de la symbiose, pour la plante, dépasse les avantages (Johnson, Graham et al. 1997). De nombreux

polypores parasitent, à différents niveaux, les arbres et certains d'entre eux comme *Laetiporus sulphureus* (polypore soufré) et *Inonotus obliquus* (polypore oblique ou communément appelé le chaga) sont comestibles et recherchés par les mycologues (McNeil 2006). Les champignons peuvent aussi parasiter d'autres champignons, le genre *Hypomyces* contient beaucoup d'espèces parasitaires qui s'attaquent aux amanites, aux bolets ainsi qu'aux russules et aux lactaires (Beug, Bessette et al. 2014).

1.3 Diversité et abondance des champignons

Les champignons représentent le règne le plus diversifié après les insectes (Blackwell 2011). Avec plus de 120 000 espèces acceptées, la diversité fongique serait estimée jusqu'à 3.8 millions d'espèces sur terre (Hawksworth et Luecking 2017). Le taux de nouvelles découvertes d'espèces ne montre aucun signe d'atteinte d'un plateau, mais plutôt une accélération avec l'arrivée des approches moléculaires (Hawksworth et Luecking 2017). Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit et le métabarcoding (ADNe) sur les échantillons environnementaux (eau, sol, air, tissus, contenu gastrique, etc.) permettent d'estimer rapidement et de façon plus complète les organismes ciblés sans la nécessité de voir les espèces, mais via la présence de leur ADN dans l'environnement (Hebert, Cywinska et al. 2003, Hajibabaei, Singer et al. 2007, Taberlet, Coissac et al. 2012). Beaucoup de séquences d'ADN sont obtenues et peuvent ensuite être comparées à des bases de données moléculaires publiques, afin d'obtenir des assignations taxonomiques. Ces méthodes permettant d'estimer et d'étudier diverses mesures de la diversité comme la richesse spécifique (diversité alpha), mais aussi de caractériser la composition des communautés (O'Brien, Parrent et al. 2005, Schmidt, Balint et al. 2013).

La richesse spécifique est une mesure importante de la diversité, il s'agit du nombre d'espèces différentes que l'on retrouve à un endroit donné. Les champignons sont présents dans tous les écosystèmes terrestres, mais leur richesse est variable. Selon des projections à grande échelle de Tadersoo (2014), certaines régions du globe posséderaient des richesses fongiques beaucoup plus importantes (Figure 1.3).

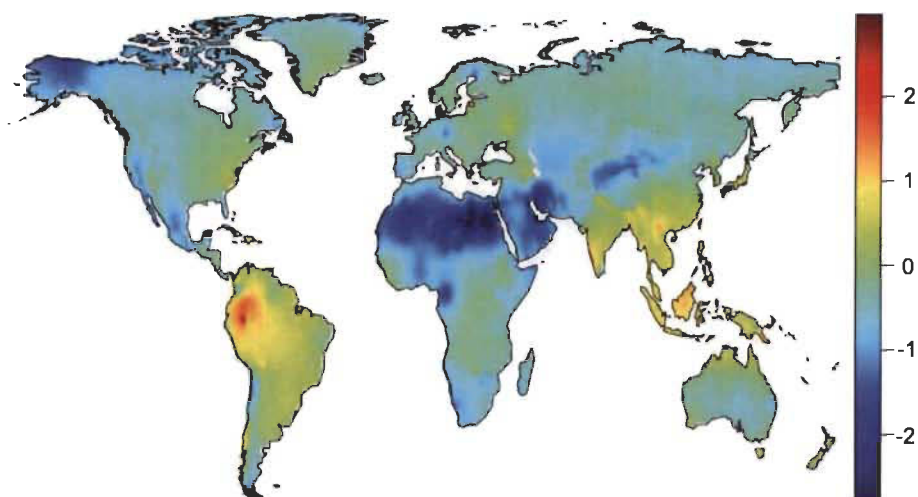


Figure 1.3 Interpolation de la richesse fongique totale à travers le globe terrestre.

Les couleurs chaudes (rouge, jaune) indiquent des sites riches contrairement aux couleurs froides (bleu). Source : Tadersoo et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. Science 346; 1256688.

Certains facteurs favorisent une richesse fongique plus élevée dans les habitats. À l'échelle globale, la distance par rapport à l'équateur et les précipitations annuelles moyennes sont des variables influentes sur la richesse fongique (Tadersoo, Bahram et al. 2014). D'autres variables écologiques démontrent aussi, dans la littérature, avoir des effets sur la richesse fongique. Le couvert en herbacée, la présence d'arbres hôtes (mycorhizes) et les composantes du sol (argile, limon) favorisent une plus grande richesse fongique (Tadersoo, Bahram et al. 2014, Tadersoo, Bahram et al. 2016, Hemkemeyer, Christensen et al. 2019), tandis que d'autres variables comme l'âge d'un peuplement et le couvert en mousse ne favorisent pas une richesse fongique élevée (Kausrud, Mathiesen et al. 2008, Boeraeve, Honnay et al. 2018).

Les habitats ne sont pas seulement caractérisés par la richesse spécifique, mais aussi sur la composition de leur communauté. C'est-à-dire quelles espèces et à quelle fréquence elles composent la communauté. Les communautés fongiques changent à travers les différents biomes forestiers, de grands groupes fongiques comme les *Leotiomycetes* sont plus fréquents dans la toundra arctique comparativement aux *Agaricomycetes* qui sont en moins grande proportion dans les forêts tempérées du sud

(Tedersoo, Bahram et al. 2014). Le pH, le climat et la végétation sont de forts prédictors des communautés fongiques à l'échelle globale, mais d'autres variables comme le feu, le broutage et les essences forestières dominantes modulent et créent des changements dans les communautés (Tedersoo, Bahram et al. 2014, Nagati, Roy et al. 2018, Santalahti 2018, Day, Dunfield et al. 2019). Différentes variables peuvent agir comme filtre environnemental et générer des patrons de structure des communautés bien spécifiques comme un fort taux de remplacement (anti nestedness) ou une forte différence de richesse (nestedness) (Podani et Schmera 2011). Identifier des variables qui influencent la richesse et les communautés fongiques peut permettre de favoriser ou de limiter certains aménagements forestiers (drainage, coupe de bois), établir des zones de conservations et anticiper comment les espèces fongiques peuvent être affectées par des événements perturbateurs. De plus, les écosystèmes peuvent être affectés lorsque surviennent des changements dans la diversité et les communautés fongiques.

1.4 Fonction des champignons dans les écosystèmes des forêts boréales et tempérées

Les champignons représentent une grosse fraction de la diversité du microbiome du sol et jouent des rôles essentiels dans le fonctionnement des écosystèmes (Baldrian 2017). Lorsque des changements surviennent dans la diversité fongique, la fonctionnalité et la performance des écosystèmes sont affectées (Wagg, Bender et al. 2014). Dans les forêts boréales et tempérées, des changements dans la richesse spécifique peuvent contribuer à affecter plusieurs fonctions dans les écosystèmes (Delgado-Baquerizo, Maestre et al. 2016, Li, Delgado-Baquerizo et al. 2019). Les espèces fongiques jouent des rôles importants au niveau de la décomposition de la matière organique, dans le cycle des nutriments et sur les espèces végétales en influençant leur croissance, survie et communauté (Cooke et Rayner 1984, Cromack Jr et Caldwell 1992, Van Der Heijden, Klironomos et al. 1998).

La décomposition de la matière organique dans les forêts boréales et tempérées est principalement déterminée par les activités fongiques (Hättenschwiler, Tiunov et al.

2005). Un apport important de matière organique dans les sols et principalement dans les forêts tempérées, est la litière forestière (feuilles, bois, aiguilles, mousses, etc.) (Bray et Gorham 1964). Les champignons permettent le renouvellement de la litière forestière notamment en étant des décomposeurs majeurs de la lignine : un des principaux composés de la litière avec la cellulose et l'hémicellulose (Valášková, Šnajdr et al. 2007). La vitesse de décomposition de la litière est plus rapide dans les sols qui possèdent une richesse fongique riche et chaque taxon serait particulièrement associé avec une composante spécifique de la litière (Dobranic et Zak 1999, Štursová, Žifčáková et al. 2012). Les ascomycètes, par exemple, seraient les organismes les plus impliqués dans la dégradation de la cellulose présente dans la litière (Štursová, Žifčáková et al. 2012). Les champignons sont aussi impliqués dans la formation, la dégradation et la stabilisation des substances humiques, ce qui permet le renouvellement de l'humus : une couche distincte du sol forestier (Steffen, Hatakka et al. 2002). Le renouvellement et la dégradation de l'humus ainsi que de la litière sont importants dans le cycle des nutriments notamment dans le maintien du cycle du carbone (Hättenschwiler, Tiunov et al. 2005). D'ailleurs des changements dans les communautés fongiques, peuvent faire varier la concentration des nutriments dans le sol et les plantes (Xu, Thornton et al. 2013).

Les forêts tempérées et boréales représentent les plus grands puits de carbone des écosystèmes forestiers (Kasischke 2000, Pan, Birdsey et al. 2011). Les saprotrophes, par la dégradation des composés de la matière organique, recyclent ce carbone organique, ainsi que d'autres nutriments, et les rendent disponibles pour d'autres organismes (Steffen, Hatakka et al. 2002, Wardle, Bardgett et al. 2004). Lorsque la richesse en saprotrophe décroît, le renouvellement de l'azote ainsi que le taux de phosphore du sol sont diminués (Wagg, Bender et al. 2014). Les champignons mycorrhiziens influencent aussi la dynamique des nutriments en changeant la balance d'azote et de phosphore du sol par l'investissement d'enzymes extracellulaires nécessaires à l'acquisition de ces nutriments (Cheeke, Phillips et al. 2017). Dans les peuplements dominés par des espèces fongiques VAM, le ratio d'azote organique versus inorganique serait plus élevé comparativement aux peuplements où les ECM sont plus

abondants (Phillips, Brzostek et al. 2013). Par contre, le phosphore organique serait disponible en plus grande quantité dans les peuplements abondants en ECM (Rosling, Midgley et al. 2016). Les VAM auraient des capacités d'acquisition des nutriments plus limitées ainsi, les plantes utiliseraient principalement des formes inorganiques d'azote qui sont plus mobiles (Smith et Smith 2011). Les peuplements des forêts tempérées, dominés par les VAM, seraient caractérisés par une décomposition rapide de la litière et un taux élevé de minéralisation du carbone et de l'azote (Phillips, Brzostek et al. 2013). Dans les forêts boréales et tempérées, le cycle des nutriments peut être fortement influencé par les champignons ECM. Contrairement au VAM, certains champignons ECM seraient capables de produire des enzymes extracellulaires capables de dégrader les composantes structurales de la matière organique du sol, telles que la cellulose, la lignine et la pectine afin de libérer du phosphore et de l'azote (Read et Perez-Moreno 2003, Courty, Buée et al. 2010). Cela permettrait de faciliter, par une voie directe, le transfert des nutriments vers les espèces végétales, qui sont des facteurs limitants à leur croissance (Burke, Weintraub et al. 2011). Ce sont des éléments qui démontrent que lorsqu'il y a des changements dans les communautés fongiques, la décomposition de la matière organique et la balance en nutriment sont affectées.

Presque toutes les plantes des forêts boréales et tempérées sont mycorhizées, soit par des mycorhizes VAM ou ECM, pour augmenter leur apport en nutriments et en eau (Van Der Heijden, Martin et al. 2015). Les sols des forêts boréales sont généralement limités en nutriments et spécialement en azote (Chalot et Brun 1998). La production primaire chez les plantes est généralement limitée par la disponibilité de ces nutriments, elles ont donc comme principale stratégie d'investir dans les associations mycorhiziennes (Smith et Read 2010). Les mycorhizes ont un impact sur la croissance des plantes et leur survie. La majorité des plantes herbacées dans les écosystèmes boréaux et tempérés sont dépendantes des mycorhizes pour survivre surtout dans les sols pauvres en phosphore (Rožek, Rola et al. 2019). Tandis que chez les bryophytes, on retrouve des associations très exclusives avec certaines espèces fongiques (Heilmann-Clausen, Aude et al. 2005, Ruokolainen, Shorohova et al. 2018). La dépendance mycorhizienne des plantes est variable selon les espèces et tout dépendamment du degré

de dépendance, leur communauté peuvent être plus ou moins affectée par des changements dans la communauté fongique (Van der Heijden, Boller et al. 1998).

1.5 Les champignons forestiers comestibles

Parmi la grande diversité des champignons, certaines espèces possèdent un sporocarpe visible à l'œil (Figure 1.2). Ces champignons, nommés macromycètes, sont caractérisés par différentes formes, tailles et apparences et peuvent fréquemment être rencontrés dans les forêts et les champs. La grande majorité d'entre eux sont non comestibles ou ne valent pas la peine d'être consommés, mais il y a tout de même beaucoup d'espèces qui sont comestibles. Les guides d'identification des champignons ne sont souvent pas d'accord sur la comestibilité de certaines espèces. Cela s'explique par la prudence vis-à-vis de certaines espèces qui nécessitent des prétraitements avant la consommation (blanchissement), peuvent contenir des toxines lorsque accumulées à long terme sont néfastes ou que certaines consommations locales, dans certains pays, sont ignorées. La *Gyromitra esculenta* (Gyromitre commune) est une spécialité culinaire en Europe, mais au Canada elle est fortement déconseillée (Boa 2006, McNeil 2006). Les espèces comestibles sont réparties dans deux grands groupes, les basidiomycètes et les ascomycètes (Boa 2006, McNeil 2006). Chez les basidiomycètes, on retrouve des champignons comestibles divisés en plusieurs catégories selon des caractéristiques visibles au niveau du chapeau. On retrouve les champignons à lames (*Russula*, *Lactarius*, *Catathelasma*, *Cantharellula*, *Coprinus*, *Pleurotus*), à aiguillons (*Hydnum*), à tubes (*Suillus*, *Boletus*, *Leccinum*), à plis (*Cantharellus*, *Craterellus*) et d'autres formes (*Lycoperdon*). Chez les ascomycètes, les individus du genre *Morchella* (morille) et *Tuber* (truffe) sont les principaux comestibles. La plupart des champignons forestiers comestibles sont des macromycètes symbiotiques appartenant à la catégorie des ectomycorhizes (McNeil 2006, Fortin, Plenchette et al. 2016). Les relations sont très complexes entre les champignons et leur environnement. Certaines espèces se retrouvent exclusivement dans certains types de milieux et d'autres peuvent être associées à des types de peuplements très spécifiques. Le *Tricholoma magnivelare* (matsutake américain) connu pour coloniser de vieux peuplements de pin gris, clairsemés, avec un

sol bien drainé et une litière forestière mince (Amaranthus, Pilz et al. 2000, Bergius et Danell 2000, McNeil 2006) ou encore *Craterellus tubaeformis* (chanterelle en tube) que l'on retrouve fréquemment dans des milieux humides avec un fort couvert de sphaignes, comme les tourbières et fortement associée à la pruche (Trappe 2004, McNeil 2006). Cela rend la culture chez les champignons forestiers comestibles, en dehors de leur habitat, difficile, voire impossible, et le principal moyen d'obtenir la ressource est la cueillette en forêt, bien que certaines espèces fassent exception. Les truffes (*Tuber* spp), sont des champignons mycorhiziens qui sont cultivés à grande échelle dans des plantations de chêne en France, Italie, Espagne et d'autres régions du globe (De Miguel, Águeda et al. 2014). Des recherches récentes ont aussi permis de cultiver artificiellement certaines espèces à haute valeur commerciale comme la morille noire (*Morchella importuna*, *Morchella sextalata* et *Morchella eximiaqui*) qui est maintenant cultivée en Chine (Liu, Ma et al. 2018). Généralement les espèces cultivées sont saprophytes. Elles peuvent être cultivées sur différents types de substrats comme des copeaux ou des billes de bois, fumier ou autres substrats organiques (café, cotons de maïs). Les espèces dominantes sur le marché mondial sont *Agaricus bisporus* (champignons de paris), *Lentinula edodes* (Shiitake) ainsi que des espèces du genre *Pleurotus* et *Pholiota* (Boa 2006).

Les champignons forestiers comestibles fournissent deux bénéfices majeurs à la population : ils contribuent au régime alimentaire et sont une source de revenus et d'emplois. Les champignons sont en grande partie constitués d'eau (environ 90 %), ce qui en résulte une faible quantité de masse sèche. Les protéines, les minéraux et les glucides constituent les composants principaux de leur matière sèche, tandis que la teneur des lipides est relativement faible (Boa 2006, Kalač 2009). Les champignons forestiers sont faibles en calories, en gras et apportent des bénéfices nutritionnels. Ils sont une excellente source de nutriments par leur apport en acides aminés essentiels, en vitamine B comme la riboflavin, mais aussi en sélénium, cuivre et potassium. Ils apportent aussi une diète riche en fibres via la présence de chitine et de bêta-glucanes (Kalač 2009, Feeney, Dwyer et al. 2014). En général, les champignons auraient un contenu en protéines plus élevé que certaines espèces végétales et une valeur

nutritionnelle en protéines comparable aux aliments d'origines animales (Friedman 1996, Kalač 2009, Wani, Bodha et al. 2010). Les champignons forestiers seraient aussi une source riche en antioxydants tels que l'ergothionéine et le glutathion (Kalaras, Richie et al. 2017). Ils sont d'ailleurs la source alimentaire principale d'ergothionéines, un antioxydant constitué de soufre qui jouerait des rôles importants chez la santé de l'humain par la forte présence de transporteurs dans de nombreux tissus et étant un antioxydant qui protégerait les mitochondries contre le stress oxydatif (Tanret 1909, Gründemann, Harlfinger et al. 2005, Paul et Snyder 2010). Le glutathion quant à lui, est un antioxydant intracellulaire présent chez presque tous les organismes. Il aurait aussi comme fonction d'éliminer certaines toxines et substances cancérigènes, d'être impliqué dans les processus post-translationnel des protéines et dans le maintien des fonctions immunitaires (Giustarini, Rossi et al. 2004). *Cantharellus cibarius* aurait une faible quantité (mg/g masse sèche) de glutathion comparé à d'autres espèces comestibles comme *Boletus edulis* ou *Grifola Frondosa* (maitake) qui posséderaient un contenu plus élevé. Tandis que chez l'ergothionéine, des quantités plus élevées ont été détectées chez les pleurotes (*Pleurotus* spp) (Kalaras, Richie et al. 2017). Dans certains pays du monde comme l'Afrique centrale, la Chine, l'Inde et le Mexique la consommation de champignons sauvages comestibles n'est pas un choix, mais une nécessité surtout en période de famine (Boa 2006).

En Europe et en Amérique du Nord, les champignons sont consommés par choix et ils sont considérés comme des aliments de luxes permettant d'agrémenter les plats. Peu importe la raison de leur consommation, la cueillette et le commerce des champignons forestiers comestibles génèrent des sources de revenus et d'emplois. L'exportation du matsutake américain (*Tricholoma magnivelare*) du nord-ouest de l'Amérique du Nord vers les pays asiatiques est un marché très lucratif. Avec le déclin du matsutake japonais, (*Tricholoma matsutake*), la valeur cueillie en 2000 se chiffrait à 33 dollars le kg frais (Pilz et Molina 2002). *Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis*, *Morchella* spp et *Tuber* spp font partie des espèces les plus lucratives sur le marché (Pilz et Molina 2002, Boa 2006). Dans les populations rurales, les régions éloignées et les régions où les possibilités de revenus sont faibles, la récolte locale ou commerciale

bénéficie à la communauté. Au Québec la Timiskaming First Nation, une communauté Anishnabe au nord du Témiscamingue, développe depuis plusieurs années un projet communautaire et social impliquant les produits forestiers non ligneux (PFNL) qui inclut les champignons forestiers comestibles (D. Bisson, communication personnelle, 14 août 2019). Environ 25 PFNL sont cueillis, transformés et vendus de mai à novembre (les produits séchés sont vendus toute l'année) permettant des revenus tout au long de l'année. On ne parle pas de grosses cueillettes commerciales, mais plutôt locales qui permettent de faire travailler la communauté et de donner un revenu. Certains restaurateurs sont aussi impliqués dans l'achat des produits. Ce projet a permis et permet toujours, de faire travailler les gens de la communauté notamment des jeunes ou des parents monoparentaux pour lesquels les opportunités d'emplois dans la région sont faibles. D'autres impacts se sont aussi fait sentir au niveau de la communauté tels que le sentiment de retour à la terre et la réappropriation de la culture.

1.6 Importance des champignons forestiers comestibles au Québec

La forêt boréale est une importante ressource naturelle au Canada via l'exploitation de la biomasse forestière, la faune et les produits forestiers non ligneux (PFNL). Les PFNL ont été beaucoup mis en valeur depuis la chute de l'industrie forestière. Il s'agit de végétaux, de sous-produits végétaux ou des produits forestiers autres que le bois. Les produits de l'érable, les petits fruits, les noix et les champignons forestiers en sont des exemples. Au Québec, près de 3000 espèces fongiques sont répertoriées dont environ 1000 seraient considérées comestibles (Mycoquébec.org). Cependant, un nombre réduit d'espèces comestibles ont une valeur et présentent un potentiel de commercialisation. Parmi les espèces les plus recherchées sur nos marchés, on retrouve le bolet cèpes (*Boletus edulis*), la chanterelle commune (*Cantharellus cibarius*), la morille (*Morchella* spp), le champignon crabe (complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*), l'armillaire ventru (*Catathelasma ventricosum*) et le tricholome à grand voile (*Tricholoma magnivelare*) (Figure 1.4) (Deslandes. J 2001, Biopterre 2009, Gévry 2011). Bien sûr d'autres espèces comme la chanterelle en tube (*Craterellus tubaeformis*), l'hydne ombiliqué (*Hydnum umbilicatum*), l'hydne sinué

(*Hydnum repandum*), le lactaire à odeur d'érable (*Lactarius helvus*) et le lépiste nu (*Lepista nuda*) sont de très bons comestibles avec une valeur commerciale.

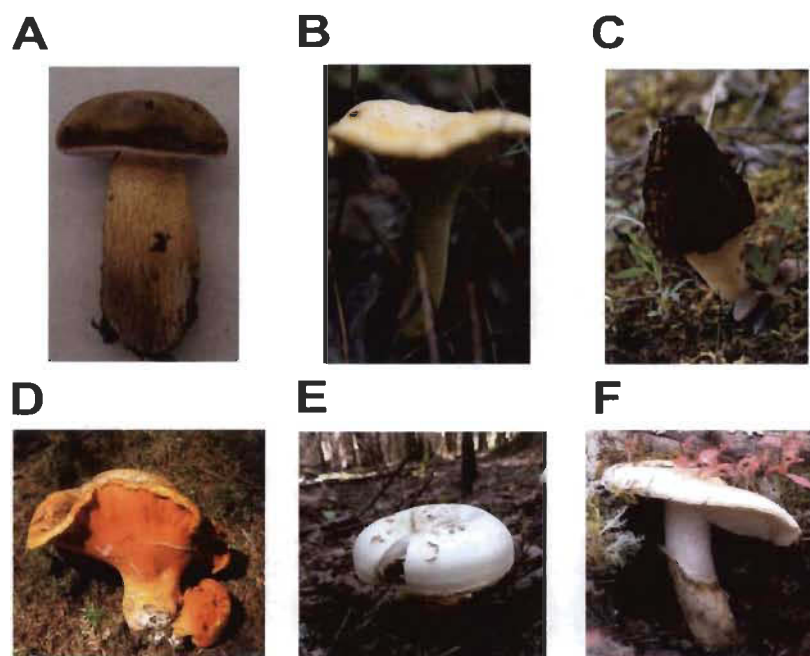


Figure 1.4 Représentation de champignons forestiers comestibles les plus recherchés sur le marché québécois.

(A) *Boletus edulis*, (B) *Cantharellus cibarius*, (C) *Morchella* spp, (D) champignon crabe (complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*), (E) *Catathelasma ventricosum* et (F) *Tricholoma magnivelare*.
Source : (A)(B)(C)(D)(E) Photos personnelles Genevieve Laperriere
(F) Tirée de mycomauricie.com

Au Québec, les champignons forestiers comestibles suscitent un intérêt toujours grandissant. Ils sont appréciés pour leur aspect gastronomique et pour la source de revenus qu'ils peuvent apporter. Cet intérêt grandissant est dû à la présence de plusieurs organisations qui promeuvent la consommation des champignons forestiers, la récolte durable, les retombées économiques sur les communautés et les activités mycologiques. On compte une douzaine de cercles ou de clubs de mycologie à travers la province (Fédération québécoise des groupes de mycologues : fqgmyco.org). Le marché québécois s'est progressivement développé et plusieurs régions se sont positionnées sur le marché des champignons forestiers. Ceci a résulté en la réalisation de plusieurs études sur la mise en valeur, le potentiel de récolte, les inventaires fongiques et

sur la répartition des champignons forestiers comestibles à potentiel commercial. En Outaouais, une étude sur la mise en valeurs des produits forestiers de la forêt feuillue a identifié une dizaine d'espèces de champignons pouvant faire l'objet de cueillette commerciale et a dressé, pour la première fois, en Outaouais un inventaire des champignons comestibles (Deslandes. J 2001). En Estrie et au Lac-Saint-Jean, des évaluations de potentiel de cueillette ont été réalisées et certains habitats offrant les meilleurs rendements ont été ciblés (Fallu 2004, Gévry 2011). Certaines variables environnementales seraient à préconiser pour l'identification des zones à haut potentiel de récolte (Gévry 2010). Les propriétés pharmaceutiques et cosméceutiques sur une quinzaine d'espèces de la forêt boréale ont fait l'objet d'une étude démontrant que des extraits de *Boletus edulis* ont stimulé la croissance de fibroblastes et que le champignon crabe (complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*) aurait des activités antimicrobiennes (Plourde 2016). Des filières mycologiques ont aussi vu le jour en Mauricie et dans la région du Kamouraska, démontrant l'intérêt du développement du mycotourisme.

Ce marché québécois, reste encore moins important que l'Ouest canadien et américain qui possèdent une exportation importante de matsutake (*Tricholoma magnivelare*) vers le Japon ou dans certaines régions de l'Europe et de l'Asie où les macromycètes sont très bien connus et que la mycosylviculture est une pratique bien établie (Boa 2006). Dans l'Ouest canadien, c'est plus d'une quarantaine d'espèces qui sont commercialisées et la commercialisation est mieux développée dû à un climat plus favorable, à des traditions mycologiques plus présentes, à la présence de nombreux marchés locaux, à la dominance du marché par des espèces sauvages et aux connaissances de la ressource (distribution, habitat) (Fortin, Piché et al. 2000). Les entreprises québécoises ont aussi de la difficulté à faire compétition à d'autres entreprises qui importent des champignons frais ou séchés provenant d'ailleurs au Canada ou d'autres pays (Biopterre 2009). Les compagnies émergentes se retrouvent aussi en compétition pour s'approprier de la visibilité et du marché (restaurateurs, épicerie fines, grossistes ou marchés locaux). Des problèmes de logistiques reliés aux transports et à l'entreposage sont aussi des obstacles aux développements. Malgré les

difficultés, le potentiel de développement au Québec est présent. Selon des chiffres de 2008, 25 tonnes de champignons forestiers auraient été récoltées au Québec et on estime que les récoltes se chiffraient à une valeur potentielle entre 10 et 30 millions de dollars (Biopterre 2009). La demande est principalement pour les champignons frais et séchés, mais les produits surgelés ou transformés (marinade, poudre) sont aussi commercialisés.

1.7 Problématiques et objectifs de recherche

Le frein majeur au développement et à la conservation de la ressource fongique au Québec est le faible niveau de connaissance en mycologie. La diversité fongique globale au Québec est très peu décrite et les études ayant fait des recensements ont dressé des portraits globaux via l'occurrence des sporocarpes (Villeneuve, Grandtner et al. 1989, Natel et Neumann 1992, Deslandes. J 2001, Fallu 2004, Gévry 2010, Langlois, Archambault et al. 2013). Or les inventaires sont souvent incomplets dû à la variabilité interannuelle des champignons, les sporocarpes qui sont éphémères et qu'une grande majorité des espèces fongiques possèdent des sporocarpes non visibles à l'œil. De plus, les inventaires écoforestiers, effectués aux 10 ans, n'incluent pas de données fongiques (Ministère Faune, Forêt et Parcs : mffp.gouv.qc.ca). Les macromycètes sont donc l'objet des études, alors qu'une grande diversité de la fonge reste inconnue et que tous les champignons, peu importe leur groupe fonctionnel, vont jouer des rôles importants dans les écosystèmes (décomposition, cycle des nutriments). Des changements dans la diversité fongique peuvent affecter le rendement des écosystèmes. Il est donc primordial de connaître les facteurs environnementaux qui influent sur la richesse et les communautés fongiques.

Nous avons aussi un retard considérable dans la littérature scientifique si on compare aux plantes vasculaires. Nombre de nos champignons comestibles à fort potentiel commercial sont méconnus au niveau de leur écologie et de leur biologie. Afin de mieux développer l'industrie et la commercialisation des champignons forestiers, il importe de connaître le portrait de la ressource. Les cueilleurs sont à la base

de la chaîne de commercialisation. Nous devons leur fournir des outils pour localiser la ressource et faciliter les récoltes. Pour valoriser la ressource et organiser une industrie fonctionnelle, on doit localiser et cartographier les sites potentiels de cueillette et connaître la distribution des espèces d'intérêts et leur habitat préférentiel. Par la suite, les sites de cueillette seront plus faciles à cibler.

En dernier point, certaines espèces présentes sur nos territoires et ayant un potentiel commercial important sont peu connues et possèdent peu de littérature scientifique à leur sujet. C'est le cas du champignon crabe (Complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*) qui pourtant, fait partie de nos espèces les plus recherchées sur nos marchés. Seulement trois études publiées, dont une datant des années 2000, décrivent sa biologie et son type d'habitat (Hanlin 1963, Rogerson et Samuels 1994, Rochon, Pare et al. 2009). Une meilleure connaissance de sa biologie et des faits prouvés scientifiquement (espèces qui le composent, production de molécules d'intérêts, etc.) permettrait d'ajouter de la crédibilité à ce champignon et de favoriser une meilleure commercialisation.

Plus spécifiquement les objectifs de cette thèse sont les suivants :

1.7.1 Estimer la diversité fongique globale sur une partie du territoire québécois et identifier des variables environnementales influençant la richesse et les communautés fongiques

Ce projet a été réalisé en partenariat avec une entreprise œuvrant dans les ressources naturelles depuis plus de 30 ans, la compagnie Progigraph située à Val d'Or (Québec, Canada). Cette compagnie possède une expertise en géomatique et génère des cartes de potentiel pour beaucoup de produits forestiers non ligneux. Malheureusement, avec le manque de données sur les champignons dans la région, les cartes de potentiel pour les espèces fongiques sont difficiles, voire impossibles à réaliser. C'est aussi un problème pour les communautés autochtones, qui se sont jointes au projet, qui travaillent avec Progigraph sur l'exploitation de la ressource. Ce premier objectif consistait à faire un portrait global de la diversité fongique à travers une partie de la forêt boréale et

tempérée du Québec (Abitibi-Témiscamingue, Haute-Mauricie et Mauricie). Ces régions sont en demande au niveau des champignons forestiers et il s'agissait des secteurs où œuvraient la compagnie et plusieurs communautés autochtones. La richesse spécifique et la composition des communautés fongiques sont les mesures de la diversité qui ont été étudiées. Ces deux aspects de la diversité ont démontré, dans la littérature, leur effet sur les écosystèmes lorsqu'elles subissent des changements, mais aussi qu'elles peuvent être modulées par des variables environnementales. Les résultats de métabarcoding ont permis d'obtenir des données de fréquence (présence/absence) pour chaque site et ainsi être en mesure de calculer une richesse spécifique par site ainsi qu'une estimation de la composition des communautés. Des indices de diversité utilisant des données d'abondance ou de proportion n'ont pas été utilisés. Chaque peuplement a aussi été caractérisé pour plusieurs variables écologiques afin d'identifier de forts prédictors de la richesse fongique et de la composition des communautés.

Afin d'obtenir une estimation la plus complète possible, la diversité fongique a été obtenue par séquençage à haut débit d'ADN extrait d'échantillons de sol. Dans le début des années 2000, Hébert et al (2003) ont identifié des régions dans le génome des organismes vivants permettant d'identifier les espèces à partir de l'ADN. Cette méthode s'appelle le barcoding moléculaire (Hebert, Cywinska et al. 2003). Ils ont identifié le gène mitochondrial pour la cytochrome *c* oxydase I (COI) comme étant un potentiel code-barres génétique chez les animaux. Aujourd'hui, il s'agit du code-barres génétique le plus couramment utilisé chez les mammifères. Chez les plantes on a identifié le gène chloroplastique codant pour la grande sous-unité de la ribulose (rbcL) et le gène de la maturase K (matK) comme code-barres (Hebert, Cywinska et al. 2003, Hollingsworth, Forrest et al. 2009). Tandis que chez les champignons, le code-barres de choix est la région ITS (Internal Transcribed Spacer) et chez les bactéries le gène ribosomal de la petite sous-unité (16S) est le plus connu (Schoch, Seifert et al. 2012, Lebonah, Dileep et al. 2014). Ces régions possèdent des zones très bien conservées entre les organismes, mais aussi des zones plus variables qui permettent de distinguer les espèces. Le barcoding moléculaire permet aussi d'identifier et de caractériser la diversité en organismes présents dans un environnement à partir d'un échantillon ce qu'on appelle

métabarcoding (Taberlet, Coissac et al. 2012). Le métabarcoding est souvent appliqué sur des échantillons environnementaux afin de caractériser des méta communautés (Taberlet, Coissac et al. 2012, Fahner, Shokralla et al. 2016, Valentini, Taberlet et al. 2016).

Dans le cadre de cette étude, des échantillons de sol ont été récoltés dans différents types de peuplement afin d'en extraire l'ADN total. Ainsi il n'était pas nécessaire de voir les sporocarpes puisque les champignons étaient détectés via leur ADN dans le sol. Il a ensuite été possible de cibler les champignons par l'utilisation d'amorces universelles spécifiques ciblant une région bien précise dans le génome la région ITS : bien connue comme code-barres génétique chez les champignons (Figure 1.5) (Schoch, Seifert et al. 2012). La région ITS2 a été sélectionnée dû au choix des amorces puisque les deux régions, ITS1 et ITS2, ont une résolution taxonomique, une couverture d'amplification et une présence dans les bases de données moléculaires similaires (Blaalid, Kumar et al. 2013, Badotti, de Oliveira et al. 2017). L'amorce fITS7 commence plus loin dans la région conservée 5.8S et utilisée avec l'amorce ITS4, donne un amplicon court d'environ 300 paires de bases idéales pour le Illumina Miseq (Figure 1.5). De plus, cette combinaison d'amorces est spécifique aux champignons, a peu de succès d'amplification chez les plantes et fonctionne sur plusieurs types de sols : un critère de choix dans le cas de notre étude (Ihrmark, Bödeker et al. 2012). Après un PCR (amplification en chaîne par polymérase) de nombreuses séquences d'ADN ont été amplifiées et envoyées au séquençage Illumina MiSeq. Le séquençage à haut débit permet de séquencer individuellement chaque séquence et ainsi obtenir leur enchaînement de nucléotides. Cette technologie permet aussi d'insérer des identifiants uniques afin de pouvoir trier les séquences en fonction de l'échantillon auxquelles elles proviennent. Les séquences ont ensuite passé par plusieurs étapes et seules les séquences utiles et de bonnes qualités ont été gardées. La figure 1.6 schématise les différentes étapes du metabarcoding chez les champignons. Finalement, les séquences ont été regroupées selon un pourcentage de similarité à l'aide de plusieurs programmes informatiques. Chaque groupement représente un OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle) qui est ensuite comparé à des bases de données moléculaires publiques

afin d'obtenir une assignation taxonomique qui peut avoir différents degrés de résolution (règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre ou espèce). Dans la majorité des cas les OTUs n'obtiennent pas d'assignation.

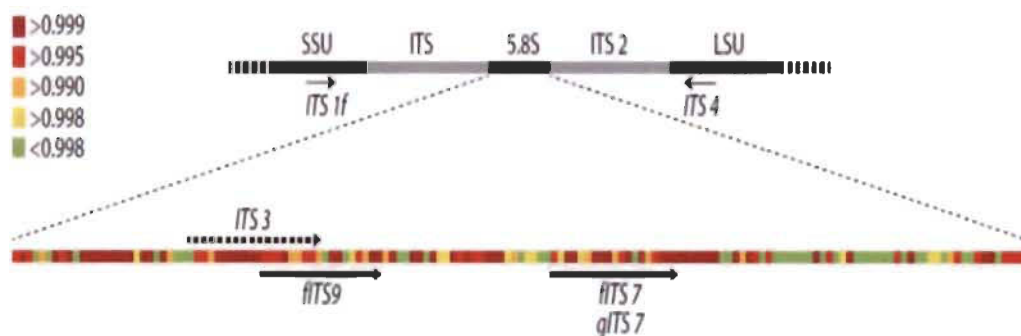


Figure 1.5 Schématisation de la région ITS (Internal Transcribed Spacers) et ses amorces.

Elle est représentée par les gènes ribosomaux de la petite sous-unité (SSU), la région conservée du 5.8S, la grande sous-unité (LSU) ainsi que les régions transcrits, mais non traduites ITS1 et ITS2. La partie du bas, représente un focus sur la zone très conservée du gène ribosomal 5.8S et la localisation des différentes amorces sens (ITS1F, ITS3, fITS7 et gITS7) et anti-sens (ITS4). Les zones en rouge représentent des zones où les nucléotides sont très conservés entre les espèces fongiques comparativement aux zones vertes qui sont plus variables. Source : Ihrmark et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. FEMS microbiology ecology 82 (3); 666-677.

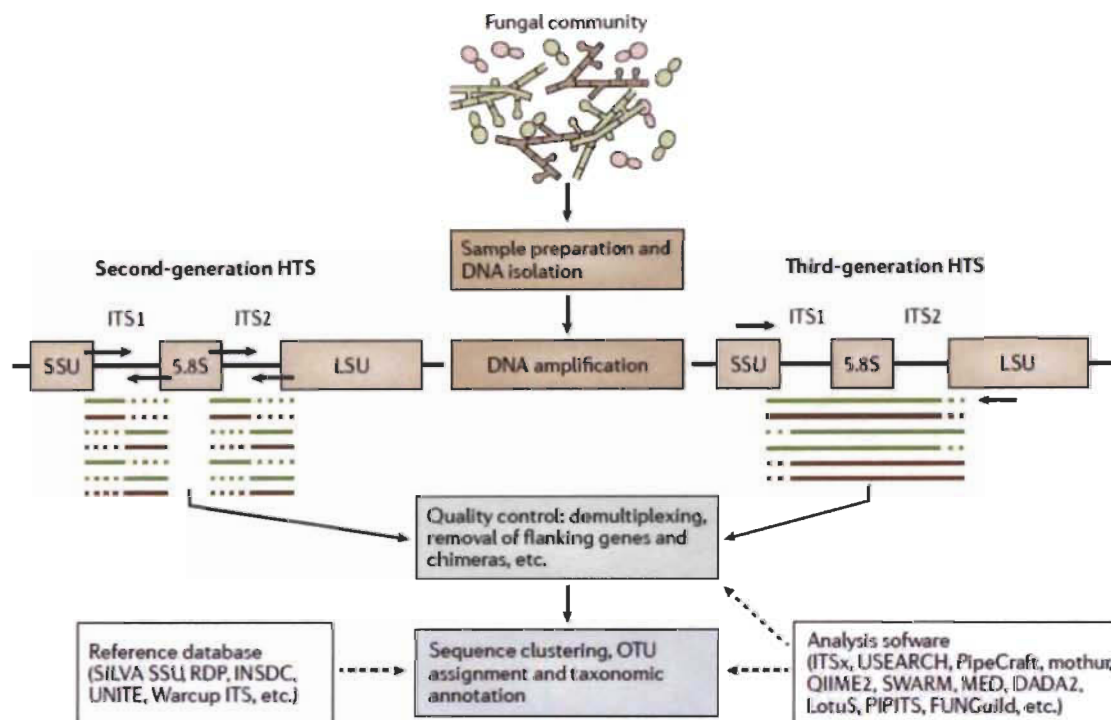


Figure 1.6 Schéma représentant les étapes principales dans un projet de metabarcoding chez les champignons.

On part d'un échantillon environnemental qui contient de l'ADN des organismes ciblés pour ensuite l'extraire et l'amplifier en ciblant un code-barres spécifique à l'organisme (ici les champignons). Les séquences sont envoyées au séquençage à haut débit qui permet de séquencer plusieurs séquences simultanément afin d'obtenir la communauté complète (metabarcoding). Ensuite un traitement bio-informatique permet de retirer toutes les séquences de mauvaises qualités et inutilisables. Les séquences conservées sont regroupées en OTU. Les OTUs sont comparés à des bases de données moléculaires publiques afin d'obtenir des assignations taxonomiques. Différentes analyses de communautés, à l'aide de la composition en OTUs, peuvent être faites avec plusieurs types de plateformes ou de logiciels. Source : Nilsson et al. (2018). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*; 1.

Pour la caractérisation des peuplements, nous avons accès à une base de données écoforestières qui contenait des données sur 75 paramètres pour plus de 33 000 polygones forestiers dans la province. Afin de choisir la plus grande diversité de peuplement possible, nous avons présélectionné certains paramètres identifiés comme influents sur la distribution des champignons via les revues de littérature, les articles scientifiques et les connaissances des mycologues. Le type de drainage du sol regroupé

en trois catégories (sec, moyen ou humide), l'âge du peuplement (jeune (20-79 ans) ou vieux (80 ans et plus)), le type de dépôt de surface représenté par six catégories (argile, tourbière, fluvio-glaciaire, sable, till et btill) et l'essence forestière dominante (bouleau blanc, peuplier faux-tremble, épinette blanche, pin gris (naturel et plantation), épinette noire, sapin baumier, érable rouge, feuillus intolérants et plantation de résineux mélangés) ont servi de critères de sélection et représentaient la majorité des polygones forestiers dans les régions de l'Abitibi, la Haute-Mauricie et la Mauricie. Lors de l'échantillonnage d'autres variables, pouvant avoir un impact ou étant retrouvées dans la littérature comme affectant les champignons, ont été mesurées telles que l'épaisseur de la litière forestière (correspondant aux feuilles, mousses et débris végétaux à la surface du sol dont l'épaisseur a été mesurée avant d'être retirée), de l'humus (horizon organique du sol) et des pourcentages de recouvrement (arbres, arbustes, herbacées, mousses et lichens). Des analyses physico-chimiques ont aussi été faites sur le sol de chaque peuplement. Le pH, le potentiel redox, le pourcentage de matière organique ainsi que le contenu en limon, sable et argile ont été utilisés dans cette étude. Les résultats de cette étude font l'objet du chapitre II de cette thèse et ont été publiés dans le journal *Forests* le 2 décembre 2019.

1.7.2 Identifier de forts prédicteurs de présence chez des espèces fongiques d'intérêts et cartographier les sites potentiels de présence

Les données fongiques et d'habitats obtenues dans le premier objectif ont été utilisées pour ce deuxième objectif. Les méthodes moléculaires ont permis de détecter plusieurs groupes de champignons, dont certaines espèces d'intérêts. Avec la collaboration de la compagnie Progigraph et des communautés autochtones, ce projet visait à faire un focus sur certaines espèces fongiques. En combinant les données de présence/absence de certaines espèces fongiques avec les variables de l'habitat, les objectifs étaient d'identifier des variables préférentielles et de générer des cartes de potentiel de présence.

Préalablement, une base de données moléculaires a été construite avec des séquences d'ADN de la région ITS provenant de spécimens fongiques récoltés au

Québec ou dans le Canada. Il existe de nombreuses bases de données moléculaires publiques (NCBI, iBOLD, UNITE), mais elles contiennent peu de séquence provenant de spécimens fongiques du Canada, ce qui constituait un autre manque majeur d'informations sur nos espèces locales. De plus, les bases de données peuvent contenir des sources d'erreurs (mauvaise identification d'espèce). De plus, chez certaines espèces, il existe beaucoup de grandes variabilités génétiques entre différentes régions ou pays (Dunham, O'dell et al. 2003, Leonardi, Paolocci et al. 2005). Une base de données locales nous assurait d'obtenir une résolution taxonomique plus précise (à l'espèce). Le choix des espèces fongiques, pour lesquelles nous voulions une référence moléculaire, s'est fait avec la compagnie Progigraph et en fonction de la demande dans le milieu mycologique. La liste comporte majoritairement des espèces comestibles, mais des espèces non comestibles étant des sosies d'espèces comestibles et souvent confondues ainsi que des espèces toxiques ou mortelles ont aussi été incluses (espèces à risque). Les espèces dont nous n'avons obtenu aucun spécimen ont été retirées (Tableau 1.1). Les espèces à risque doivent être répertoriées afin de mettre en garde les cueilleurs des zones à risque. Des références moléculaires doivent aussi être disponibles afin d'être en mesure de détecter des champignons non comestibles ou mortels dans des produits transformés dont il est difficile d'identifier le contenu (poudre, sauce). Des spécimens ont été cueillis un peu partout sur le territoire du Québec en Mauricie, Haute-Mauricie, Abitibi, Bas St-Laurent, Outaouais et la région de Québec. Le Royal Ontario Museum, le centre de développement des bioproduits (Biopierre) ainsi que le Centre de Foresterie des Laurentides ont fourni des spécimens et des séquences. Le but étant d'avoir plusieurs séquences récoltées dans différentes régions. Après extraction de l'ADN génomique, la totalité de la région ITS (ITS1 et ITS2) a été amplifiée avec les amorces universelles ITS1F et ITS4 donnant un amplicon d'environ 600 paires de bases (Figure 1.5) et envoyée au séquençage Sanger au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Au total 169 codes-barres sont présents dans notre base de données moléculaires locales et seront déposés dans les bases de données publiques comme iBOLD et UNITE (Tableau 1.1).

Tableau 1.1

Liste des espèces fongiques et leur nombre de séquences ITS présentes dans
notre base de données moléculaires locales

Nom latin	Nom commun	Séquences ITS
Comestibles		
<i>Albatrellus ovinus</i>	Polypore des brebis	2
<i>Boletus edulis</i>	Cèpes d'Amérique	7
<i>Boletus subglabripes</i>	Bolet à pied glabrescent	3
<i>Boletus variipes</i>	Bolet à pied variable	1
<i>Cantharellula umbonata</i>	Clitocybe omboné	2
<i>Cantharellus cibarius</i>	Chanterelle commune	5
<i>Catathelasma ventricosum</i>	Armillaire ventru	3
<i>Craterellus fallax</i>	Fausse corne d'abondance	3
<i>Craterellus tubaeformis</i>	Chanterelle en tube	4
<i>Gyroporus castaneus</i>	Bolet maron	2
<i>Gyroporus cyanescens</i>	Bolet bleuissant	4
<i>Hydnum repandum</i>	Hydne sinueux	6
<i>Hydnum umbilicatum</i>	Hydne ombiliqué	4
<i>Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes</i>	Champignon crabe	5
<i>Lactarius deterrimus</i>	Lactaire des épinettes	2
<i>Lactarius helvus</i>	Lactaire à odeur d'érable	2
<i>Lactarius thyinos</i>	Lactaire saumoné	4
<i>Leccinum holopus</i>	Bolet blanc de neige	2
<i>Lepista nuda</i>	Lépiste nu	3
<i>Morchella spp</i>	Morille (blonde et noire)	10
<i>Russula brevipes</i>	Russule à pied court	6
<i>Russula paludosa</i>	Russule des marais	6
<i>Russula peckii</i>	Russule de peck	8
<i>Sarcodon squamosus/imbricatus</i>	Hydne écailleux	4
<i>Suillus granulatus</i>	Bolet granulé	3
<i>Tricholoma equestre</i>	Tricholome équestre	5
<i>Tricholoma magnivelare</i>	Matsutake américain	10
Non comestible/toxique/mortelle		
<i>Amanita muscaria</i>	Amanite tue-mouche	7
<i>Amanita virosa</i>	Amanite vireuse	4
<i>Galerina marginata</i>	Galérine marginée	5
<i>Gomphus floccosus</i>	Chanterelle à flocon	2
<i>Gyromitra esculenta</i>	Gyromitre commune	5
<i>Lactarius affini/trivialis</i>	Lactaire affine	4
<i>Lactarius deceptivus</i>	Lactaire décevant	6
<i>Omphalotus illudens</i>	Clitocybe lumineux	1
<i>Paxillus involutus</i>	Paxille enroulé	4
<i>Russula emetica</i>	Russule émétique	4
<i>Suillus tomentosus</i>	Bolet tomenteux	2
<i>Tricholoma pessundatum</i>	Tricholome ruiné	2
<i>Tylopilus felleus</i>	Bolet amer	5

Des modèles mathématiques basés sur l'occurrence des espèces et les variables environnementales d'un site peuvent être utilisés pour prédire la distribution d'une espèce ciblée (Franklin 2010). Plusieurs méthodes sont utilisées pour générer des modèles de répartition des espèces (SDM) telles que les régressions linéaires (GLMs, GAMs) (Guisan, Edwards Jr et al. 2002) ou les méthodes d'apprentissage automatique (Random Forest, MaxEnt) (Breiman 2001, Phillips, Anderson et al. 2006). Les données d'occurrence, quant à elles, peuvent provenir de recensement (Yuan, Wei et al. 2015, Torres 2017) ou d'un herbarium (Wollan, Bakkestuen et al. 2008). Dans le cadre de cette étude, les données d'occurrence provenaient des résultats de séquençage sur l'ADN extrait d'échantillons de sol et ont été comparées avec les bases moléculaires publiques ainsi que notre base de données moléculaires locales. Les méthodes de régression linéaire généralisée (GLMs) ont aussi été choisies pour générer un modèle mathématique permettant de prédire la distribution de champignons d'intérêts. L'espèce *Amanita muscaria* (Amanite tue-mouche) a été utilisée comme exemple afin de démontrer le potentiel de notre méthodologie : c'est-à-dire utiliser des données de séquençages, d'écologies et de géomatiques afin de générer et de sélectionner des modèles linéaires généralisés pouvant être appliqués sur des bases de données écoforestières pour créer des cartes. L'espèce avait aussi une occurrence élevée à travers les sites. Cette méthodologie a été par la suite appliquée, par la compagnie Progigraph, sur des espèces comestibles d'intérêts dont les résultats des modèles n'ont pas été utilisés dans le cadre d'une publication. En plus d'avoir obtenu une occurrence élevée à travers nos sites, *A. muscaria* est un champignon bien connu, toxique et présent sur une bonne partie du territoire québécois.

Pour générer les cartes de potentiel de présence, les résultats des modèles linéaires généralisés (binomial) ont été appliqués à la grandeur des polygones forestiers disponibles dans les bases de Progigraph, permettant ainsi de prédire la probabilité de présence de l'espèce en fonction de la valeur des différentes variables retrouvées dans les différents peuplements écoforestiers. Ces travaux font l'objet du chapitre III de cette thèse et sont en préparation pour soumission, sous forme de courte communication, dans la revue *Journal of Fungi*.

1.7.3 Étudier la biologie d'une espèce comestible à fort potentiel commercial et unique à l'Amérique du Nord, le champignon crabe (complexe *Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*)

Le champignon crabe est un champignon comestible constitué de deux espèces. Il s'agit plus précisément d'un ascomycète, *Hypomyces lactifluorum*, qui parasite un autre champignon du genre *Russula*, la russule à pied court (*Russula brevipes*) (Beug, Bessette et al. 2014). Une fois parasité, son sporocarpe change de couleur, de forme et de saveur (McNeil 2006). Malheureusement, peu d'études ont investigué la biologie du champignon crabe (Hanlin 1963, Rogerson et Samuels 1994, Rochon, Pare et al. 2009). Pour ce troisième objectif, nous avons étudié en détail la biologie de ce champignon recherché sur nos marchés et unique à l'Amérique du Nord. Nous avons investigué la distribution des deux espèces à travers le sporocarpe durant différents stades de transformation de la russule. Selon le même principe des codes-barres génétique, nous avons créé des amorces spécifiques pour *R. brevipes* et *H. lactifluorum*, ce qui a permis de distinguer leur ADN respectif par PCR quantitatif. Le profil de métabolites a aussi été étudié chez une russule parasitée et non parasitée afin d'expliquer le changement dans sa saveur. Cette étude a fait l'objet d'un article scientifique publié dans le journal *Genome* le 7 mars 2018 et fait l'objet du chapitre IV de cette thèse.

CHAPITRE II

ESTIMATION OF FUNGAL DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF MAJOR ABIOTIC DRIVERS INFLUENCING FUNGAL RICHNESS AND COMMUNITIES IN NORTHERN TEMPERATE AND BOREAL QUEBEC FORESTS

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui a été publié en anglais dans la revue *Forests* le 2 décembre 2019. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs. La référence de cet article est la suivante :

Laperriere G, Chagnon P-L, Giguère-Tremblay R, Morneau A, Bisson D, Maire V and Germain H. Estimation of fungal diversity and identification of major abiotic drivers influencing fungal richness and communities in northern temperate and boreal Quebec forests. *Forests* **2019**, 10 (12), 1096.

2.1 Contributions des auteurs

Genevieve Laperriere a effectué, en majorité, la conception de l'étude, l'échantillonnage terrain, la réalisation des expérimentations, l'analyse de données ainsi que l'écriture du manuscrit. Pierre-Luc Chagnon, par son expertise, a grandement contribué à l'analyse des données ainsi qu'à la révision et l'écriture du manuscrit. Roxanne Giguère-Tremblay a participé à l'échantillonnage terrain, effectué des analyses physico-chimiques du sol, a apporté son aide dans les analyses statistiques et a fait des commentaires dans le manuscrit. Amélie Morneau a participé à l'échantillonnage terrain, a effectué les analyses de pH et Eh du sol et a fait des commentaires sur le manuscrit. Danny Bisson a contribué, par son expertise en géomatique, aux choix des sites d'échantillonnage et comme support technique. Vincent Maire a participé à l'échantillonnage terrain, a contribué par son expertise aux analyses statistiques ainsi qu'à la révision et l'écriture du manuscrit. Hugo Germain est le directeur de recherche

du laboratoire. Il a supervisé le projet, participé à l'échantillonnage terrain, contribué au design expérimental, a révisé et participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu les subventions pour l'étude.

2.2 Résumé de l'article (français)

Les champignons jouent des rôles importants dans les écosystèmes forestiers et la caractérisation de leur diversité est cruciale pour le développement et l'élaboration de stratégies efficaces pour leur conservation. Des changements dans la diversité fongique peuvent avoir des impacts sévères sur la fonctionnalité des écosystèmes tels que le cycle des nutriments et la dégradation de la matière organique. Malheureusement, la diversité fongique des forêts boréales et tempérées est peu décrite et on en connaît peu sur le fonctionnement des variables abiotiques sur la modulation de la richesse et de la composition fongique. Les objectifs de cette étude étaient de faire une caractérisation globale de la richesse et de la composition fongique dans la province du Québec et d'identifier les principales variables abiotiques qui les modulent.

Deux cent soixante-deux (262) sites à travers la forêt boréale et tempérée dans les régions de l'Abitibi-Témiscamingue, de la Mauricie et de la Haute-Mauricie ont été échantillonnés. Pour chaque site, des échantillons de sol ont été récoltés afin d'estimer la diversité fongique par séquençage Illumina et plusieurs variables abiotiques ont été mesurées (ex. épaisseur de l'humus, pH du sol, pourcentage de recouvrement, etc.). L'effet des variables abiotiques sur la richesse fongique a été testé en utilisant des modèles linéaires généralisés (GLMs) tandis que la différence dans les compositions fongiques entre les sites a été analysée en utilisant comme tests statistiques une analyse multivariée permutational de la variance (PERMANOVA) ainsi qu'une analyse de partitionnement de la bêta-diversité.

L'ordre des *Agaricales*, *Heliotiales* et *Russulales* ont été les taxons fongiques les plus fréquents à travers nos sites échantillonnés. Les sites du nord de l'Abitibi-Témiscamingue ont obtenu la richesse en OTUs la plus élevée. L'âge du

peuplement et la couverture en mousse ont été identifiés comme de forts prédictors de la richesse fongique à travers notre échantillonnage. Cependant dans le cas de la composition des communautés fongiques, les variables les plus influentes ont été identifiées comme étant le pH du sol, les précipitations moyennes pendant la saison de croissance ainsi que l'âge du peuplement bien qu'une grande partie de la variance soit restée inexpliquée dans nos modèles. Dans l'ensemble, la méta communauté fongique régionale était caractérisée par un fort taux de remplacement des espèces même quand les OTUs les plus rares étaient retirés. Cela pourrait indiquer un fort filtrage environnemental par plusieurs variables abiotiques qui n'ont pas été mesurées dans cette étude ou par des limitations, plus fortes qu'attendu, dans les communautés fongiques du sol. Nos résultats démontrent à quel point il peut être difficile de prédire l'assemblage des communautés fongiques même avec un fort effort d'échantillonnage incluant plusieurs peuplements et l'inclusion de plusieurs variables abiotiques pertinentes.

2.3 Article complet (anglais) : Estimation of fungal diversity and identification of major abiotic drivers influencing fungal richness and communities in northern temperate and boreal Quebec forests

Abstract

Fungi play important roles in forest ecosystems and understanding fungal diversity is crucial to address essential questions about species conservation and ecosystems management. Changes in fungal diversity can have severe impacts on ecosystem functionality. Unfortunately, little is known about fungal diversity in northern temperate and boreal forests, and we have yet to understand how abiotic variables shape fungal richness and composition. Our objectives were to make an overview of the fungal richness and the community composition in the region and identify their major abiotic drivers. We sampled 262 stands across the northern temperate and boreal Quebec forest located in the region of Abitibi-Témiscamingue, Mauricie, and Haute-Mauricie. At each site, we characterized fungal composition using Illumina sequencing, as well as several potential abiotic drivers (e.g., humus thickness, soil pH, vegetation cover, etc.). We tested effects of abiotic drivers on species richness using generalized linear models, while difference in fungal composition between stands was analyzed with permutational multivariate analysis of variance and beta-diversity partitioning analyses. Fungi from the order *Agaricales*, *Helotiales*, and *Russulales* were the most frequent and sites from the north of Abitibi-Témiscamingue showed the highest OTUs (Operational Taxonomic Unit) richness. Stand age and moss cover were the best predictors of fungal richness. On the other hand, the strongest drivers of fungal community structure were soil pH, average cumulative precipitation, and stand age, although much of community variance was left unexplained in our models. Overall, our regional metacommunity was characterized by high turnover rate, even when rare OTUs were removed. This may indicate strong environmental filtering by several unmeasured abiotic filters, or stronger than expected dispersal limitations in soil fungal communities. Our results show how difficult it can be to predict fungal community assembly even with high replication and efforts to include several biologically relevant explanatory variables.

Introduction

Fungi represents the most diverse groups on Earth after insects [1]. They are diverse in terms of shape, color, and lifestyle and they are distributed throughout the globe in all types of terrestrial and aquatic ecosystems, and even in extreme life conditions such as those prevailing in the Antarctic [2,3]. They play pivotal roles in ecosystem functioning by modulating nutrient cycling, organic matter decomposition, carbon storage, and plant nutrition through the formation of mutualistic symbiosis [4–7]. Several studies have shown that ecosystems functionality is altered when changes occur in soil fungal diversity [5,6] which is why they are used as a forest and soil health bioindicator [8,9]. In addition some species, especially edibles, are an important source of income and a significant component of the diet, particularly in developing countries and remote regions [10]. Unfortunately, fungal diversity can change because of time, climate, biota, topography, natural disturbance, or human caused perturbation and contamination [11–14]. For these reasons, there is interest in developing approaches to predict various facets of fungal diversity, and how it is likely to change over space and time in natural and managed ecosystems.

Fungal species richness, an intuitive component of fungal diversity, is often used to compare habitats, as species diversity is often assumed to reflect, at least partly, niche diversity when limiting similarity drive species coexistence [15]. Fungal richness has also been linked to key ecosystem parameters and functions such as litter decomposition rates [16] or soil and plant nutrient content [7]. Many abiotic variables can influence species richness. In the case of fungi, climatic variables such as mean annual precipitation and temperature are important drivers of fungal richness at global scale [17], but other variables such as vegetation cover [18], tree species [19], and soil texture [20] can have positive or negative impacts on richness.

Beyond the simple counting of species number (i.e., α -diversity), another way to characterize biodiversity is to study the composition of the community and how it changes across sites (i.e., β -diversity). Understanding compositional pattern of species helps researchers to understand different aspects of species interaction and ecosystem

function [21,22]. β -diversity patterns can also guide conservation practices, for example by providing knowledge about the uniqueness of community composition in the landscape [23]. Community dissimilarity can stem from two mutually exclusive, and thus additive, components: richness difference (i.e., nestedness) and compositional turnover/replacement [21]. Because these components are additive fractions of community β -diversity, they can easily be mapped in a ternary plot linking nestedness, turnover, and community similarity (i.e., $1-\beta$) [22]. Such β -diversity partitioning analyses can help formulate more specific hypotheses regarding the potential drivers of community dissimilarity in a metacommunity [24].

Nevertheless, in Quebec, Canada, fungal diversity in northern temperate and boreal forests is generally poorly described. A reliable and exhaustive global description of the fungal diversity is needed for the protection and conservation of fungal species, and to further predict changes in fungal richness and community composition in our forests. This lack of data represents an obstacle for mycologist and for companies working with natural resources, and data is needed to improve forest fungal biodiversity conservation and management. The main aim of this study was to sample the northern temperate and boreal Quebec forests; to (1) make an overview of the fungal richness and the community composition; and (2) identify the main environmental drivers of these facets of fungal biodiversity.

Materials and Methods

Study sites and soil sampling

The sampling design consisted of 262 sites that were located in three different regions in the province of Quebec (Canada). The sites were divided in 130 stands located in Abitibi-Témiscamingue (AT), 50 stands in Haute-Mauricie (HM), and 82 stands in Mauricie (MAU) (Figure 1). We used a forest inventory database composed of 75 abiotic variables and 33,000 stands, released in 2009, through the Ministry of Forest and Parks of the province of Quebec. This database served to identify

and locate sites according to four ecological parameters used by stakeholders: the stand age, the dominant tree species, the level of drainage, and the surficial deposit. We selected sites to obtain the largest diversity of ecological parameters combinations that characterized each region. Sites also had to be accessible by road. Sites were sampled between June and September 2017. For each site, we used ropes to delimitate a representative area of 400 m² (20 x 20 m). In each site, two 20 m transects were established 10 m apart from one another. The forest litter was removed from the surface and 6 soil cores of 20 cm depth were collected every 5 m along the transects. Soil samples were pooled, mixed and a subsample was taken for DNA analyses and stored immediately on ice and at -20 °C at the end of the day. The rest of the soil samples were sieved and stored at different temperature depending of the future analyses (see below).

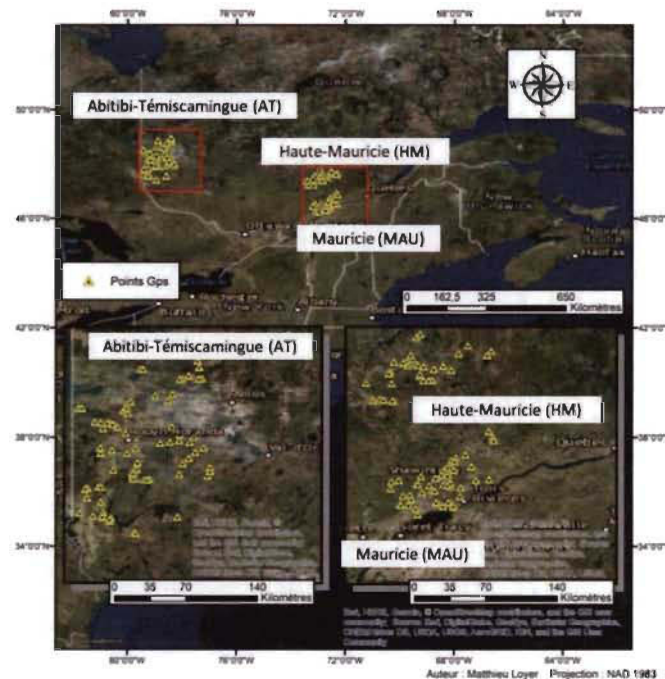


Figure 1 GPS localization of the 262 sampled sites divided in three regions representing 130 sites in Abitibi-Témiscamingue (AT), 50 sites in Haute-Mauricie (HM) and 82 sites in Mauricie (MAU). The map represents the province of Québec and each yellow triangle represents a site sampled between June and September 2017.

Clustering of sites into climatic domains

Using georeferenced information of the 249 stands (positive at sequencing step), we extracted historical climatic data ranging from 1974 to 2008, from the site of the government of Canada (<https://ouvert.canada.ca>) (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Total degree-days (based on 0, 5, and 10 °C), mean length of the season without frost ($T_{\min} \leq 0, -1, -2, -3, \text{ and } -4^{\circ}\text{C}$), mean length of the growing season, average cumulative precipitation during the growing season, and the mean temperature during the growing season (calculated with the total degree-days based on 0 divided by the length of the growing season) were used for K-means clustering with kmeans function and cluster package in R software v.3.5.3 [25,26]. This resulted in three climatic domains distributed as follows: 70 sites, mostly localized at the north of Abitibi-Témiscamingue (exception of four sites in Haute-Mauricie and two in south of Abitibi), were grouped in domain 1 (NAT), domain 2 (MAU) contained 79 sites situated in Mauricie and domain 3 (SAT-HM) included 100 sites from the south of Abitibi-Témiscamingue (exception of five sites at the north) and Haute-Mauricie (see Figure S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>).

Site characterization

We used forest inventory databases (see above) to get information about stand age, dominant tree species, level of drainage and surficial deposit (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). In addition, we measured in the representative area a series of variables that are known to modulate fungi presence [27–29]. For the vegetation stratum (trees, shrubs (diameter at breast height (DBH) <9 cm), herbaceous, mosses, and lichens), the coverage percentage (between 0% to 100%) values were attributed for each stratum at each end of the 400 m² area. Then, means were calculated and density cover classes was assigned according to the protocol of Ministère des Forêts du Québec, Service des Inventaires Forestiers [30]. For the statistical analysis, the density classes were changed to an ordinal scale between 0 and 7 ((81%–100%) = 7, (61%–80%) = 6,

(41%–60%) = 5, (26%–40%) = 4, (6%–25%) = 3, (2%–5%) = 2, (1%) = 1, 0 = 0). Thickness of the litter layer was represented by plant residues on the surface of the soil (dead leaves, needles, and living mosses) and thickness of humus by the organic layer in the soil (represented by the horizon F and H). Both were measured in centimeter (cm).

Soil analysis

Part of the soil sample from each site was dried at room temperature to measure pH (hydrogen potential) and Eh (redox potential) with the method proposed by Husson et al. [31]. Measurements were made using platinum M241Pt electrodes and a 10Mhoms resistance multimeter inside a Faraday cage. The measure was considered stable after 30 s. Because Eh and pH are strongly correlated values, Eh was standardized for a pH of 7 based on Equation (1) where the Eh is measure in volts, R the perfect gas constant ($8.314471 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F the Faraday constant ($96485.3383 \text{ C mol}^{-1}$), and T the temperature (Kelvin):

$$\text{EhpH7} = \text{Eh} - \text{RT/F} * \text{Ln}10 * (7 - \text{pH}) \quad (1)$$

Temperature and pH were taken with a pH electrode (HI 1292D HANNA) immediately after the Eh. Organic matter (OM) was measured by mass loss ignition (550°C during 5 h). After heating, the soil was analyzed for texture using a Fritsch Analysette 22 microtech plus to get the content (%) of silt, sand, and clay.

Soil DNA extraction, amplification and sequencing

Soil for DNA was kept frozen in -20°C until extraction and then DNA from 0.30 g of soil was extracted with the DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Montreal, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. 200 μL of 100 μM ammonium aluminium sulfate ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$) was added, as an additional step, in the column to remove inhibitors such as humic acid and increase PCR efficiency on several types of soil (clayey, sandy) [32]. DNA was eluted in 100 μl . PCR reactions were performed in a volume of 25 μl containing 2.5 μl of 10x standard Taq buffer (100 mMTris-HCl,

500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.5 µl of dNTPs (10 mM), 0.5 µl of primers (20 mM), 0.25 µl of standard Taq DNA polymerase, 2 µl of total soil DNA and 18.75 µl of nuclease free water. We amplified the ITS2 region with the universal fungal primers fITS7 and ITS4 with a CS1 (ACACTGACGACATGGTTCTACA) and CS2 (TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT) tag added at the 5' extremities [33,34]. Three different melting temperatures were used for each PCR reaction with the following thermocycling conditions: 34 cycles of 30s at 94 °C, 30s at three different melting temperatures of 48, 51, and 58 °C, and 1 min 30s at 72 °C. Reactions were preceded by a 3 min denaturation step at 94 °C and terminated with a 5 min elongation step at 72 °C. If no PCR band was obtained, a 1/10 dilution of the total soil DNA was prepared. Positive PCR from the same sites (3 PCR x 256 sites) were pooled and sent for sequencing. A second PCR was done to add adapters and barcodes (one barcode per site), libraries were quantified and the sequencing was performed with Illumina MiSeq PE 300 following the procedures of Quebec Genome Innovation Center of McGill University (Montreal, QC, Canada).

Bioinformatic analysis

Raw sequences were demultiplexed and adapters and barcodes were removed for 249 sites (7 samples didn't work at sequencing). The sequences were uploaded to the Galaxy web platform v.1.1.2-806.1 and analyzed for quality using the FastQC Read Quality reports v.0.72 [35,36]. Then sequences were filtered and trimmed (trimleft = c (19, 20), truncLen = c (230, 200), maxN = 0, maxEE = c (2, 2), minLen = 150) using dada2 package v. 1.7.9 in R [26,37]. Only sequences longer than 150 bp with a mean number of expected errors below 2 were kept, trimming these to keep only the first 230 bp for the forward reads and the 200 bp for the reverse reads. Paired-ends sequences were merged using Fastq-join (pN = 0, mN = 20) in the Galaxy web platform [38]. Then Fastq files were converted in Fasta files with FASTX-toolkit v.1.0.2 and ID sequences were changed for the unique number ID of the sites using Seqkit v 0.8.0 [39,40]. The open source software ITSx v. 1.1.1 was used to remove conserved regions (5.8S and 28S) may be present in our ITS2 amplicon [41]. Finally, dereplication

procedure for each site was independently (sample level) applied using Vsearch v. 2.8.0 and then all files (249 files corresponding to 249 sites) were combined in one single Fasta file in order to obtain one OTU data file and compare fungal composition between all sites [42]. Then, the dereplication procedure was repeated, but across all sequences. We removed singletons (minuniquesize = 2) chimera sequences using the reference database (UNITE/UCHIME reference datasets v.7.2) and de novo chimeras, and we clustered sequences (id = 0.97) and performed taxonomic assignation (id = 0.98) with our local barcode database containing 169 barcodes from fungi collected in Canada (mostly in Quebec province) (see Document file S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>) and public reference databases (USEARCH/UTAX reference datasets v.7.2 from UNITE and 600,000 ITS2 sequences download from the National Center for Biotechnology Information Search database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) using Vsearch v. 2.8.0. Non fungal OTUs were removed.

Statistical analysis

We obtained two databases, one with the abiotic variables for each site and the one with presence/absence OTUs by site. All statistical analyses were coded in R [26]. Taxa frequency bar chart was created using ggplot2 [43]. To identify major abiotic drivers, we correlated fungal occurrences in 240 sites (we excluded 9 sites with missing environmental variables) with 18 abiotic variables from these sites (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Percentage of sand was not used because of high correlation with clay and silt content. Mean temperature during the growing season and average cumulative precipitation during the growing season were used as climatic variable for each sites. Other climatic data were excluded from the statistical analyses because of high colinearity. Continuous numerical variables were standardized prior to analysis. Generalize linear model with negative binomial family error distribution was used to identify the drivers of fungal OTU richness, using the MASS and MuMIn R packages for model selection based on dredge and importance functions [44,45]. A pairwise site

dissimilarity matrix based on Jaccard's index was computed for 240 sites keeping only 14 000 OTUs appearing in these 240 sites. A PERMANOVA analysis using the `adonis2` function (vegan R package) was used to explain our fungal distance/dissimilarity matrix using our set of 18 abiotic variables [46]. Prior to running the PERMANOVA analysis, we verified the assumption of multivariate dispersion using the function `betadisper` (vegan R package) [46]. To verify the homogeneity of variance for the continuous predictors, we quantified the distance of each sample in the ordination to the overall metacommunity-wide centroid, and correlated this value to the continuous variable. Principal coordinate analysis (PCoA) was used to visualize fungal community composition among sites. Beta-diversity partitioning analyses were used to evaluate whether shifts in fungal community structure were mostly due to species replacement or differences in fungal richness among sites using the `beta.div.comp` function (`coef = "J"`) from Legendre (2014) [21]. This beta-diversity partitioning could be visualized on a ternary plot using the R package Ternary [47]. Species indicator analysis was used to determine whether some species were preferentially associated with specific site characteristics [48].

Results

Taxonomy diversity

Illumina sequencing of our fungal amplicon resulted in 12,455,757 raw sequences which was pruned to 264,000 unique reads after bioinformatics treatment. Clustering at 97% yielded 14,755 OTUs (6687 singletons), out of which 4796 could be assigned to a known taxon. We merged OTUs (and their frequencies) if they received the same taxonomic assignation and removed OTUs that were assigned to non-fungal organism for a total of 252 removed OTUs. For the 249 sites, 14,503 OTUs, including 4544 OTUs with taxonomic assignation, were obtained. Figure 2 presents a global view of the taxonomic diversity, the 20 most frequent orders for all the sites and their frequency is represented for each climatic domain. The *Agaricales* represented the most frequent order with a mean of 22 OTUs per site for the bioclimatic domain NAT, 19 OTUs for

domain MAU and 12 OTUs for domain SAT-HM. The second and third most frequent order were respectively the *Helotiales* and the *Russulales* with 17 and 6 mean OTUs per site for domain NAT, 13 and 4 OTUs for domain MAU and 9 and 4 OTUs for domain SAT-HM. Other common orders were *Cantharellales*, *Boletales*, and *Hypocreales* (Figure 2).

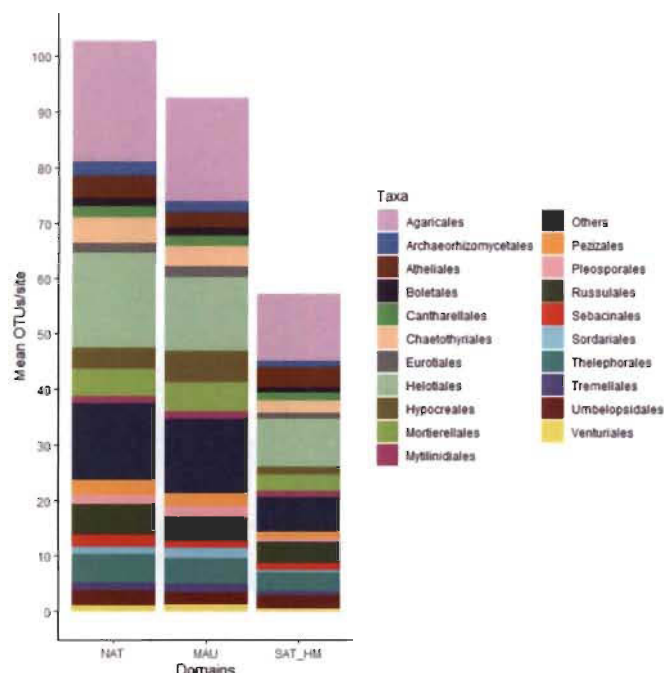


Figure 2 Taxa bar-chart for each climatic domain representing the frequency of the 20 most frequent fungal orders. In the X axis, NAT represents the sites clustered in the north of Abitibi-Témiscamingue, MAU in Mauricie, and SAT_HM in the south of Abitibi-Témiscamingue and in Haute-Mauricie. Y axis represents the mean OTUs (Operational Taxonomic Unit)/site. Each different color represents taxa.

Fungal richness

OTUs richness varied between 26 to 825 OTUs across the sites with a mean of 193 OTUs per site. Lower OTUs richness was observed in domain SAT-HM compared with domain NAT and MAU (Figure 3). We could also observe a tendency of OTUs richness to decrease in presence of higher moss cover and in older stand age but, to increase with high herb cover (Figure 4a–c). OTUs richness also varied depending on

the dominant tree species. Intolerant hardwood (IH) stands showed high fungal richness as opposed to jack pine stands (JP) (Figure 4d).

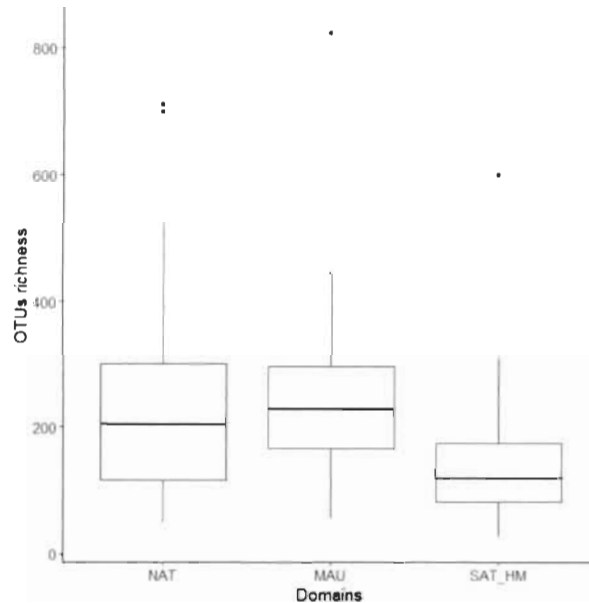
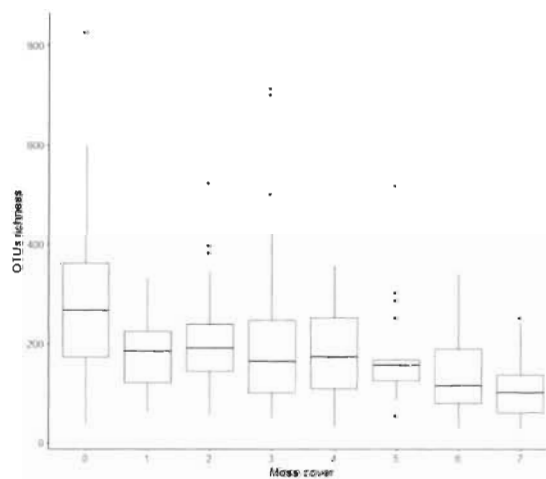
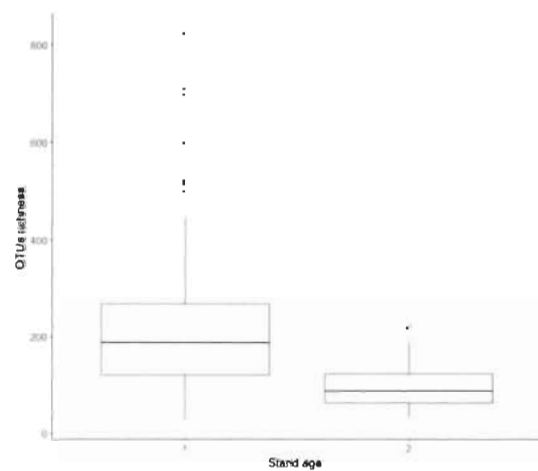


Figure 3 Box-plot indicating the distribution of the OTUs richness (249 sites) for each climatic domain. In the X axis, NAT represents the stands clustered in the north of Abitibi-Témiscamingue, MAU in Mauricie and SAT_HM in the south of Abitibi-Témiscamingue and in Haute-Mauricie. The Y axis represents the OTUs richness (number of OTUs/site).



(a)



(b)

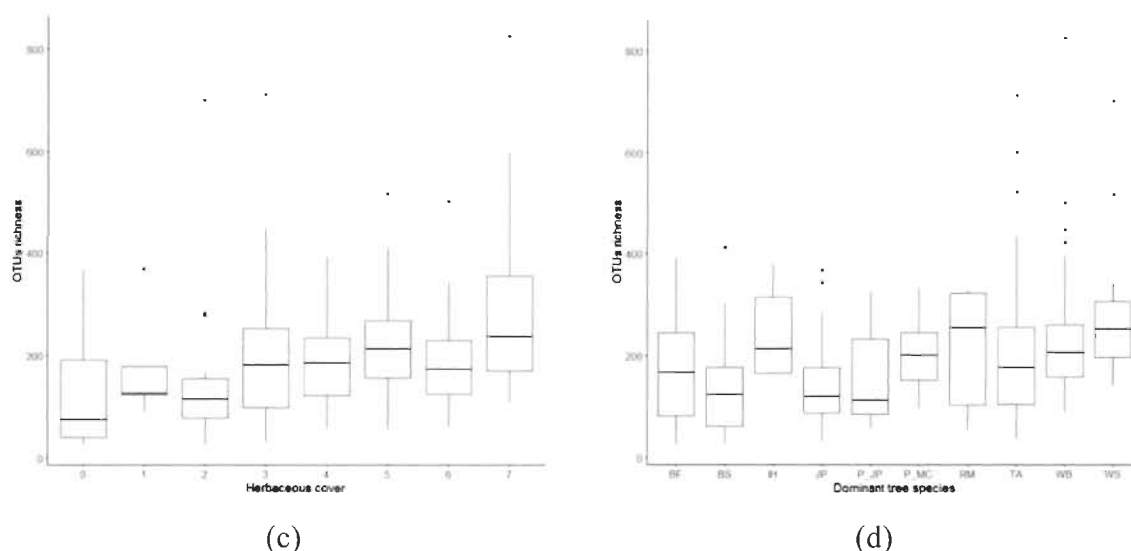


Figure 4 Box-plot representing the distribution of the OTUs richness (240 sites), depending on: (a) moss cover; (b) stand age; (c) herbaceous cover; (d) dominant tree species. For (a) and (c) X axis represents the density classes ((81%–100%) = 7, (61%–80%) = 6, (41%–60%) = 5, (26%–40%) = 4, (6%–25%) = 3, (2%–5%) = 2, (1%) = 1, 0 = 0)). For (b) X axis indicates stand age (1 = 20–79 years and 2 = 80 years and over). For (d) X axis indicates the different dominant tree species in the sites (BF = Balsam fir, BS = Black spruce, IH = Intolerant hardwood, JP = Jack pine, P_JP = Jack pine plantation, P_MC = Mixed coniferous plantation, RM = Red maple, TA = Trembling aspen, WB = White birch, and WS = White spruce). Y axis represents the OTUs richness (number of OTUs/site).

A generalized linear model was used first, with all the habitat variables, and used in dredge to performed model selection and model averaging. The dredge function generated a set of 262,144 possible combinations (see Table S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Model at the first rank (lowest AICc) included the variables stand age, average precipitation, herb cover, moss cover, soil pH and silt content, but all first six models were equivalent in weight and for Akaike's information criteria (AICc). Variables that were not included in all the first six models were deposit, drainage, Eh_{pH7}, litter, organic matter, and shrub cover. These variables also have low sum of Akaike weights, meaning they appeared in few models (Figure 5). The moss cover and the stand age stood out as the most important predictors of fungal OTUs richness with a sum of Akaike weights close to one (appeared in almost all the models) (Figure 5). Herb cover, average precipitation, silt content and lichen cover could also important predictors of fungal richness with a sum

of Akaike weights over 0.5, indicating that they appeared in half of the possible models (Figure 5).

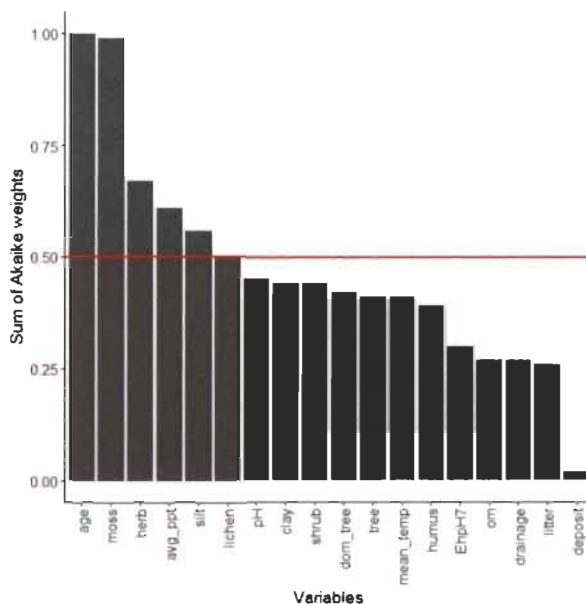


Figure 5 Bar-chart representing the importance of each of the 18 habitat variables from all possible model combinations (262,144). Y axis represents the sum of Akaike weights.

Fungal community composition

Soil pH has a significant effect on fungal composition, followed by the average cumulative precipitation and stand age (Table 1 and Figure 6). For stand age, older stand (blue) seemed slightly nested into those from younger stand (red) (Figure 6c). The multivariate dispersion analysis indicated that the assumption of variance homogeneity was violated for stand age ($F = 3.68$, $p = 0.06$) (see Document file S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). However, given the robustness of the PERMANOVA test to this assumption, this should not translate as a major bias in our downstream analyses [49]. For the continuous variables, no statistically significant correlations with their distance to the centroid were found for soil pH and average precipitation, the two best predictors (see Document file S2 and Figure S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>).

Table 1

Results of the PERMANOVA for the global fungal community.
Stars indicate the p.value significance *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Variables	R2	F	Pr(>F)
Dominant tree species	0.040	1.123	***
Deposit	0.021	1.072	**
Drainage	0.004	1.038	
Stand age	0.005	1.301	***
Tree (%)	0.004	1.018	
Shrub (%)	0.004	1.011	
Herb (%)	0.004	1.090	
Moss (%)	0.004	1.179	**
Lichen (%)	0.004	1.229	**
Litter (cm)	0.004	1.060	
Humus (cm)	0.004	1.018	
pH	0.006	1.589	***
EhpH7	0.004	1.055	*
Organic matter (%)	0.004	1.183	**
Clay content (%)	0.005	1.245	***
Silt content (%)	0.004	1.098	*
Mean temperature	0.005	1.189	**
Average precipitation	0.006	1.385	***
Residual	0.840		

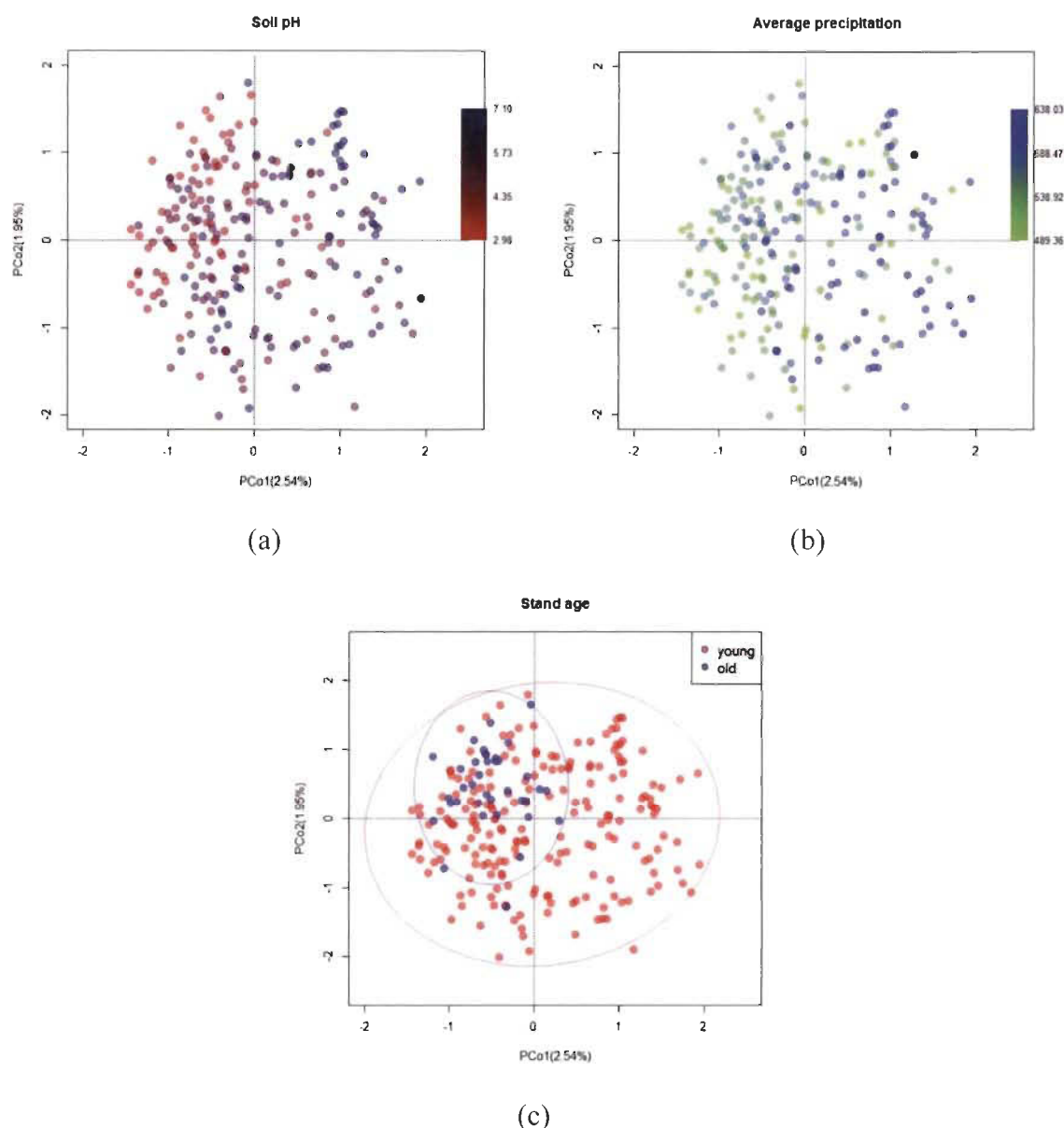


Figure 6 Sites scores for principal coordinate analysis (PCoA) with presence/absence data for 14 000 OTUs (dissimilarity matrix based on Jaccard's index) and 240 sites. Each point in the PCoA represents a site and points close to one another indicate that they are similar in their fungal composition. Values in brackets on the axes show the amount of variation in fungal composition explained by each axis; (a) Sites colored according to their soil pH values (range between 2.98 to 7.10). Color represents a gradient from low (red) to high (blue) soil pH; (b) Sites colored by their average cumulative precipitation (range between 489.36 mm to 638.03 mm). Color represents a gradient from low (green) to high (blue) average precipitation; (c) Sites colored by their stand age. Young stand (20–79 years) are colored in red and old stand (80 years and more) in blue.

We analyzed the fungal community structure with a simplex analysis of beta-diversity partitioning from pairwise comparisons of stands by using different indices that measure similarity (number of share species), relativized richness difference and relativized species replacement according to the R-script methods of Legendre et al. (2014) [21]. Values obtained were positioned into an equilateral triangle, the so-called ternary plot. High species turnover, perfect nestedness, and richness identity could be easily recognized because the points are positioned on a given side of the triangle. This analysis shows an alignment of the majority of the pairwise site comparison at the bottom of the ternary plot, which evidences species replacement as the major driver of community dissimilarity in this regional metacommunity (Figure 7a). This could be due to a very high frequency of rare taxa, which could have inflated the turnover component of beta-diversity. Yet, a similar pattern of strong turnover was observed even when only the most frequent fungi (appearing in more than 30 sites) were retained for the analysis (Figure 7b). Likewise, the pattern held constant when considering only the rarer fungal taxa (Figure 7c).

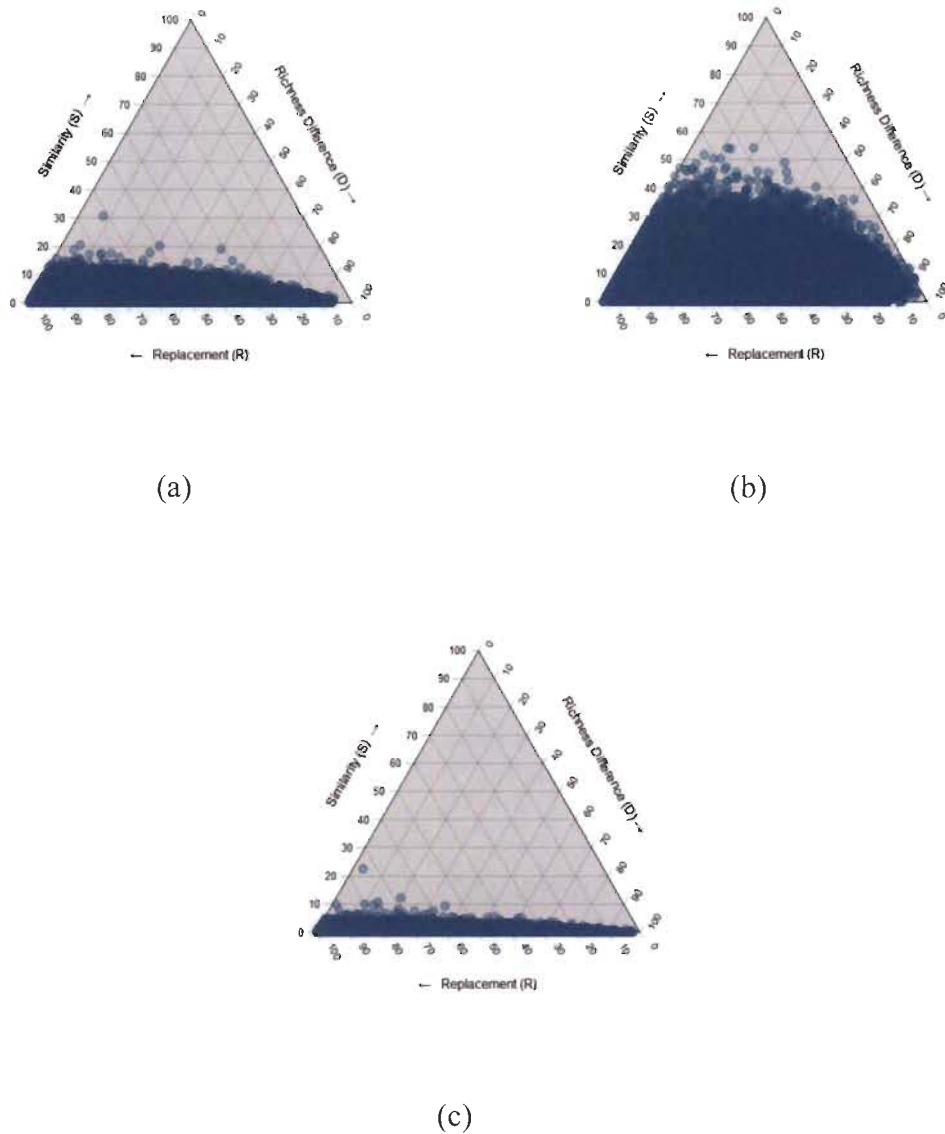


Figure 7 Triangular plot representing a beta-diversity partitioning analysis with presence/absence data with 14 000 OTUs and 240 sites. (a) Including the total OTUs (14 000); (b) Only the OTUs appearing in more than 30 sites; (c) Rarer OTUs appearing in less than 10 sites. Each blue point represents a pair of sites and their position is determined by three indices, the relativized species replacement (R), the relativized richness difference (D) and similarity (S) (dissimilarity matrix based on Jaccard's index) calculated from the R code script from Legendre (2014), values on the axis represents the contribution in percentage of each indices.

Discussion

Fungal diversity in temperate and boreal Quebec forest

Diversity in the regional species pool could be explained by the large environmental heterogeneity across our sampled sites and the sequencing depth used. Indeed, our study gathered data on highly contrasted sites differing in dominant tree species, geological substrate origin, drainage, climate, and abiotic soil parameters (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Many studies and reviews have supported the role of environmental heterogeneity in supporting greater species diversity through niche partitioning [50–52]. A study published by Tedersoo et al. (2014) also reported very large fungal richness; they sampled 365 sites across the world divided in eleven different biomes (not limited to boreal and temperate forest) and detected 44,563 nonsingleton fungal OTUs that corresponded to approximately half of the described fungal species on the globe [17]. They also observed that boreal and temperate forests were also more diverse in ectomycorrhizal and several other fungal guilds than other biomes. The three most frequent orders that characterized our regions were the *Agaricales*, *Helotiales*, and *Russulales* (Figure 2). These three groups are generally dominant in boreal forest [11,53–55]. The genus *Lactarius* and *Russula*, from the order *Russulales*, are abundant and diverse ectomycorrhizal fungi in northern forests, especially because there are host generalists [14,56,57]. In our data, the genus *Russula* and *Lactarius* represented 84% of the OTUs from the *Russulales* (see Table S3 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). *Helotiales* are common and frequently associated with roots in boreal forest [11,54], whereas the *Agaricales* are known to associate with bryophytes a dominant component of the boreal forest understory [58]. *Agaricales* and *Russulales* are also known to be abundant and diverse in temperate forests [59–63], which represented 32% of sites included in our study. In temperate forests, *Agaricales* are mostly represented by the genus *Cortinarius* and *Inocybe* [60,63]. *Cortinarius* genus represented 24% and *Inocybe* 14% of our OTUs belonging to the *Agaricales* (see Table S3 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>).

Soil was collected from June to September, which included a sampling done over two seasons (summer and beginning of fall). Fungal groups do not seem to change between season, although their abundance may change [64,65]. Active mycelium can decrease at the soil surface in the middle of summer, because of drought, but remains detectable [66]. Season should not have an impact on the global biodiversity retrieved. Unknown OTUs also represented a large proportion of the fungal diversity in our study, which was comparable to other studies using similar high-throughput sequencing methodologies [11,17,67,68]. Despite all the progress in fungal DNA barcoding, most of the fungal species in the world remains unknown for many reasons. Some species are not easily identifiable, difficult or impossible to grow in vitro, they are only represented by only one discovered specimen and in some case it is truly the first encounter [69,70].

Abiotic drivers of fungal richness

We found that predictors of the fungal richness were the stand age and the moss cover. The first ranked model included the variables stand age, average precipitation, herb cover, moss cover, soil pH and silt content, but all first six models were equivalent in weight and for Akaike's information criteria (AICc) (see Table S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Among these variables stand age and moss cover come out as the most important predictors of fungal OTUs richness (Figure 5). For moss cover, a decrease of OTUs richness was observed when the moss cover was higher (Figure 4a). Fungi living in moss covered stand, would have considerable potential to degrade carbon substrates contained in moss residues and in peatlands [71]. Mosses are well known to be recalcitrant substrates and they can affect conditions growth by maintaining high water level and slowing down the nutrient cycle [72]. They also produce secondary metabolites which would make them difficult to digest for most decomposers [73]. Only a few specialist fungi would be able to decompose moss tissues [74,75]. This could explain a lower fungal richness compared to other type of stands. In addition to moss cover, stand age come out as an important predictor (Figure 5). A decline of OTUs richness was observed in our older stand

(Figure 4b). A general trend, observed in animals and plants, is the colonization of young stand, normally newly exposed, by opportunistic species followed by an increase of species richness [76,77]. In the case of fungi, generally mature coniferous forests can support a larger number of fungal species and provide a higher fungal richness [78,79]. Blaailid et al. (2012) also observed for root-associated fungi a high fungal richness in the recently exposed area (young stand), followed by a decrease to finish with an increase of richness in more established ecosystems [80]. In these studies, only one fungal guild (mycorrhizal fungi) was taken into account. In our case the total fungal composition was measured and as such included several fungal groups. Another study compared the presence of several fungal groups over three successional forest stages (2 years, 65 years, and 110 years) and they detected fewer different groups of fungi (species richness) in the older forest than in the young and intermediate forest taken together [81]. In our data, old forests are more than 80 years old (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Such a high richness in early successional stands contrasts with other findings in western Canada where fungal richness increased over time after clearcuts or fires [82]. Early-successional stands may have increased primary productivity and also potentially higher plant diversity and these two factors can determine the diversity of soil fungal guilds [83]. Mature forest may not be able to support a large diversity of fungi because of loss and changes in nutrient and plant species. Forest productivity will reach a plateau around 40 years old for most of the tree species [84,85]. After the maximum growth, we can observe a decrease of the primary production, photosynthesis, nutrients, and an increase of dead woods [86].

Other predictors appeared in more than half of all possible models as herbaceous cover, lichen cover, average precipitation, and silt content (Figure 5). In the case of herbaceous cover, an increase in OTUs richness was observed with higher herb cover (Figure 4c). Tedersoo et al. (2016), identified that fungal richness was positively affected by herb cover [18]. Several groups of root-inhabiting fungi are related to herbaceous plants and a majority of herbaceous plants are dependent on mycorrhizae to survive especially in phosphorus poor soil [87,88]. Higher density of herbaceous cover

could provide more colonizable roots for fungi and results in a higher fungal richness [89]. For lichen cover, no information was found to explain how lichen cover can directly affect fungal richness. In our study, we evaluated cover from macrolichen living on the soil surface. One explanation would be that the type of stand where there is high abundance of lichen is not favorable for fungi. Lichen can grow on several extreme environments: on dry and hot environments, on bare rock, walls, gravestones, roof, exposed soil surfaces, etc. In our study, high lichen cover (covering more than 40% of the area) was found in stand plantation dominated by jack pine. Pine stand is known to have lower fungal richness because of forest litter that could be more acid [18,19,90]. Tree species can differentially influence fungal richness, either because of their partner selectivity or because of the local soil conditions they create [19,90]. We can see this variation in OTUs richness depending on the dominant tree species in our sites, with especially low richness under jack pine stands (Figure 4d).

One edaphic factor that appeared to be important predictor is silt content, with an importance over 0.50 and was included in the lowest AICc model (see Table S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1> and Figure 5). Fungal response to soil texture has been found elsewhere [91]. Higher global fungal richness was previously observed in fine-textured soils [20]. A reason for that may be the higher propension of fine particles to be bound within aggregates. It is well known that aggregates formation can create microenvironments for soil microbes and create refuges from predators (e.g., collembolas) in inaccessible micropores [92], but also protection for desiccation [93], heat [94], and pH fluctuation [95]. Such creation of microenvironments may have favored fungal niche partitioning locally, thus potentially increasing richness [96]. Providing more isolate microhabitat demonstrated an increase in microbial species richness [97].

Average cumulative precipitation during the growing season was also an important predictor (Table S2 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1> and Figure 5). Tedersoo et al. (2014),

previously identified mean annual precipitation as a strongest predictor with a positive effect on global fungal diversity [17]. They compared fungal richness between tropical regions and Africa, the latter had a lower fungal richness because mean annual precipitation is relatively lower. Another study noticed that the number of soil fungal taxa increases significantly with increasing mean annual precipitation [98]. An explanation of the role of precipitation on richness would be related to the fact that most of the mesophilic fungi fail to grow at less than 96% humidity. A study from Talley et al. (2002), showed that relative fungal richness increase in presence of high relative humidity (>50%) [99].

Drivers of fungal community composition

Soil pH was the main driver of fungal community composition (Table 1 and Figure 6a). This is consistent with previous studies showing that soil pH is the primary driver of fungal community composition and it is a main determinant on fungal community composition across the globe [11,17,67,100–102]. Fungi generally grow, without significant inhibition, on a wide pH ranges [103–105]. However, soil pH could drive fungal composition by changing the abundance of some fungal groups [106], on microorganism diversity [107], and soil nutrients [108]. Acidic soils are characterized by a low cation exchange capacity, particularly in magnesium and calcium, and then cations are not available to organisms, which may act as a strong environmental filter to few adapted and specialized species [109,110]. Soil pH is here confirmed as must be part of the toolkit for modeling the mushroom niche, for conservation and management purposes.

Average precipitation was also identified as important drivers of fungal community composition (Table 1 and Figure 6b). In a previous study, fungi directly responded to variation in precipitation with more abundant, diverse, and consistent communities under drought conditions and more variable communities with an increase in rainfall, but difference in the community composition was more evident when rainfall difference was over 200 mm [111]. For our sites, average cumulative precipitation range

was between 489.36 mm to 638.03 mm (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Fewer sites (blue) were at the opposite of the first PCoA axis corresponding to sites with an average cumulative precipitation over 581 mm (see Tables S1 and S4 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Over a specific stress threshold, biotic factors such as competition will be more present and determine coexistence [96]. Hawkes et al. (2011) observed increase diversity in dry periods and suggested that drought stress moderates competition among fungal taxa [111]. The species have therefore acclimated to specific precipitation conditions and to a certain level of competition and then specific groups of species should be indicative of some stands depending on precipitation level. A species indicator analysis was used to identify some indicator species between the different levels of precipitation. Fourteen genera were identified as significant indicators of low average cumulative precipitation and only three as mid average cumulative precipitation, compared to fifty-two for high average cumulative precipitation (see Table S5 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Species belonging to *Inocybe*, *Trichoderma*, and *Clitocybe* are examples of significant indicators of high average cumulative precipitation (see Table S5 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>).

For stand age, old stands (blue) seemed slightly nested compared to those from younger stands (red) (Figure 6c). Stands could be different in community composition, because of some species unique to an age-class [47,112]. We identified two genus as an indicator of old stand (80 years and more), *Gloioxanthomyces* and *Urnula* (see Table S5 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Among all the OTUs, 590 OTUs were only detected in old stand (see Tables S1 and S3 in Supplementary Materials available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>). Difference in fungal species composition among forest age classes was previously found in several studies. They explained the difference by changes in plant species composition, because plant communities evolves with time [113,114]. Additionally, accumulation of some

recalcitrant plant litter is not favorable for the survey of some fungi [115]. One study found that fungal diversity reached a plateau in 26 years-old stand and community composition was similar for stand between 65–100 years, but differ among stand over 100 years-old [82]. Another explanation could be after the maximum growth of a stand, a decrease of the primary production, photosynthesis, nutrients, and an increase of dead woods is observed and then competition to survive could be more present. Models of fungal primary succession showed that few selected species are able to colonize new area and with time they are joined or replace with more competitive species [116,117].

The fungal community structure is however characterized by a high turnover rate across the region (Figure 7). This specifically means that there were no cosmopolitan generalist fungal taxa that were present in the vast majority of our sites. Such a high replacement or turnover of fungal OTUs could reflect either (1) narrow fungal niches and strong environmental filtering [118], (2) strong interspecific competitive exclusion, or (3) historical contingencies with priority effects allowing early colonizers to prevent the establishment of latecomers [21,22,24]. Without additional data, it is impossible to determine in our dataset what the major cause of such a strong species turnover was.

Conclusions

A global overview of the fungal diversity and richness was assessed across the northern temperate and boreal Quebec forests. It allowed to localize area with high fungal richness and identified abiotic predictors across the sampled region. This could be used as a tool to follow fungal richness through time and to anticipate future changes that could be damaging to forests. A high moss cover, old stand (over 80 years) and some dominant tree species (pine stands) are not suitable for a high fungal richness contrary to herb cover and average precipitation. The structure of the fungal community in the region was unknown and now is it characterized by a high turnover rate. Fungal composition is shaped by several abiotic drivers, but we identified soil pH, average cumulative precipitation, and stand age as the most important drivers among the sampled variables. This effort to use meta-barcoding will allow a better characterization

of fungal biodiversity and community structure from soil samples across various stands in the province of Québec. Collectively, our results show how difficult it can be to predict fungal community assembly even with high replication and efforts to include several biologically relevant explanatory variables: this poses a significant challenge for fungal conservation and biodiversity management in a changing climate, as it seems that suitable fungal niches will be hard to track. The inclusion of functional traits and phylogeny could be a way to better understanding fungal biogeography [119].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/12/1096/s1>, **Figure S1.** K-means clustering of 249 sites based on the historical climatic data extracted from the site of the government of Canada using the GPS localization. Group 1 (black) includes 70 sites, mostly localized at the north of Abitibi-Témiscamingue (exception of four sites in Haute-Mauricie and two in south of Abitibi) and represents the domain NAT. Group 2 (red) has 79 sites situated in Mauricie and named domain MAU. Group 3 (green) includes 100 sites from the south of Abitibi-Témiscamingue (exception of five sites at the north) and Haute-Mauricie and represents the domain SAT-HM. **Figure S2.** Plots representing values from soil pH (a) and (b) average precipitation and in y axis, their distances to the centroid. **Document file S1.** Local fungal ITS DNA barcode reference; **Document file S2.** Multivariate dispersion results; **Table S1.** Environmental database; **Table S2.** Dredge results; **Table S3.** OTU database; **Table S4.** Ordination scores; **Table S5.** Results of species indicators analysis.

Author Contributions: L.G. contributed to the overall process of the experimental design, field sampling, laboratory manipulations, data analysis and manuscript drafting; C.P.-L. contributed with his expertise, made comments for the community analysis and ecological parts, and helped for R coding and statistical analysis; G.-T.R. participated to field sampling, executed the soil analysis, helped for R coding, and made comments; M.A. participated to field sampling, executed the pH-Eh soil analysis, and made comments; B.D. contributed with his technical support and expertise in geomatics; M.V.

contributed with his expertise, made comments for the statistical and ecological parts, participated in field sampling, and contributed to the experimental design; G.H. supervised the project, participated to field sampling, contributed to the experimental design, reviewed the manuscript, made comments, and obtained funding.

Funding: The study was funded by the Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) and the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ).

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Joelle Rancourt, Isabelle Gosselin, Perrine Juillion and Ingrid Sanchez for their help during field sampling. We also want to thanks Alexandre Brisson and Mathias Bisailon for their help during laboratory manipulations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Blackwell, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* **2011**, *98*, 426–438.
2. Gessner, M.; Gulis, V.; Kuehn, K.; Chauvet, E.; Suberkropp, K. 17 Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Environ. Microb. Relatsh.* **2007**, *4*, 301.
3. Rosa, L.H.; Vaz, A.B.; Caligiorne, R.B.; Campolina, S.; Rosa, C.A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biol.* **2009**, *32*, 161–167.
4. Clemmensen, K.; Bahr, A.; Ovaskainen, O.; Dahlberg, A.; Ekblad, A.; Wallander, H.; Stenlid, J.; Finlay, R.; Wardle, D.; Lindahl, B. Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* **2013**, *339*, 1615–1618.
5. Delgado-Baquerizo, M.; Maestre, F.T.; Reich, P.B.; Jeffries, T.C.; Gaitan, J.J.; Encinar, D.; Berdugo, M.; Campbell, C.D.; Singh, B.K. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10541.
6. Li, J.; Delgado-Baquerizo, M.; Wang, J.-T.; Hu, H.-W.; Cai, Z.-J.; Zhu, Y.-N.; Singh, B.K. Fungal richness contributes to multifunctionality in boreal forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **2019**, *136*, 107526.
7. Wagg, C.; Bender, S.F.; Widmer, F.; van der Heijden, M.G. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5266–5270.
8. Egli, S. Mycorrhizal mushroom diversity and productivity—an indicator of forest health? *Ann. For. Sci.* **2011**, *68*, 81–88.
9. Van Bruggen, A.H.; Semenov, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Appl. Soil Ecol.* **2000**, *15*, 13–24.
10. Boa, E. *Wild Edible Fungi: A Global Overview of Their Use and Importance to People* (No. 17); Food & Agriculture Org: Rome, Italy, 2004; p. 157.
11. Day, N.J.; Dunfield, K.E.; Johnstone, J.F.; Mack, M.C.; Turetsky, M.R.; Walker, X.J.; White, A.L.; Baltzer, J.L. Wildfire severity reduces richness and alters composition of soil fungal communities in boreal forests of western Canada. *Glob. Chang. Biol.* **2019**, *25*, 2310–2324.
12. Kardol, P.; Cregger, M.A.; Campy, C.E.; Classen, A.T. Soil ecosystem functioning under climate change: Plant species and community effects. *Ecology* **2010**, *91*, 767–781.

13. Monkai, J.; Hyde, K.D.; Xu, J.; Mortimer, P.E. Diversity and ecology of soil fungal communities in rubber plantations. *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31*, 1–11.
14. Santalahti, M. *Fungal Communities in Boreal Forest Soils: The Effect of Disturbances, Seasons and Soil Horizons*; Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentariae, Biologicae; Universitatis Helsinkiensis: Helsinki, Finland, 2018.
15. Silvertown, J. Plant coexistence and the niche. *Trends Ecol. Evol.* **2004**, *19*, 605–611.
16. Štursová, M.; Žifčáková, L.; Leigh, M.B.; Burgess, R.; Baldrian, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *80*, 735–746.
17. Tedersoo, L.; Bahram, M.; Põlme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N.S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L.V.; Vasco-Palacios, A.M.; Thu, P.Q.; Suija, A. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **2014**, *346*, 1256688.
18. Tedersoo, L.; Bahram, M.; Cajthaml, T.; Põlme, S.; Hiiesalu, I.; Anslan, S.; Harend, H.; Buegger, F.; Pritsch, K.; Koricheva, J. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J.* **2016**, *10*, 346.
19. Saitta, A.; Anslan, S.; Bahram, M.; Brocca, L.; Tedersoo, L. Tree species identity and diversity drive fungal richness and community composition along an elevational gradient in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* **2018**, *28*, 39–47.
20. Hemkemeyer, M.; Christensen, B.T.; Tebbe, C.C.; Hartmann, M. Taxon-specific fungal preference for distinct soil particle size fractions. *Eur. J. Soil Biol.* **2019**, *94*, 103103.
21. Legendre, P. Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **2014**, *23*, 1324–1334.
22. Podani, J.; Schmera, D. A new conceptual and methodological framework for exploring and explaining pattern in presence–absence data. *Oikos* **2011**, *120*, 1625–1638.
23. Legendre, P.; De Cáceres, M. Beta diversity as the variance of community data: Dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecol. Lett.* **2013**, *16*, 951–963.
24. Leprieux, F.; Tedesco, P.A.; Hugueny, B.; Beauchard, O.; Dürr, H.H.; Brosse, S.; Oberdorff, T. Partitioning global patterns of freshwater fish beta diversity reveals contrasting signatures of past climate changes. *Ecol. Lett.* **2011**, *14*, 325–334.

25. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R Package Version 2.0. 5; 2016: 2018. Available online: <https://www.r-project.org/>.
26. Team, R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2013. Available online: <https://www.r-project.org/>.
27. Fallu, J. Évaluation du potentiel de récolte des champignons forestiers comestibles dans les boisés de l'Estrie, Québec. 2004. Available online: <http://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/2345> (accessed on June 2019).
28. Gévry, M.-F. *Étude des Facteurs Environnementaux Déterminant la Répartition de Champignons Forestiers Comestibles en Gaspésie, Québec*; Université du Québec à Rimouski: Rimouski, QC, Canada, 2010.
29. Rochon, C.; Pare, D.; Khasa, D.P.; Fortin, J.A. Ecology and management of the lobster mushroom in an eastern Canadian jack pine stand. *Can. J. For. Res.* **2009**, *39*, 2080–2091, doi:10.1139/X09-118.
30. Saucier, J.; Berger, J.; Davignon, H. *Le Point d'observation Écologique: Normes Techniques*; Ministère des Forêts du Québec, Service des Inventaires Forestiers: Sainte-Foy, QC, Canada, 1994.
31. Husson, O.; Husson, B.; Brunet, A.; Babre, D.; Alary, K.; Sarthou, J.-P.; Charpentier, H.; Durand, M.; Benada, J.; Henry, M. Practical improvements in soil redox potential (Eh) measurement for characterisation of soil properties. Application for comparison of conventional and conservation agriculture cropping systems. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *906*, 98–109.
32. Dong, D.; Yan, A.; Liu, H.; Zhang, X.; Xu, Y. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 217–222, doi:10.1016/j.mimet.2005.11.010.
33. Ihrmark, K.; Bödeker, I.T.; Cruz-Martinez, K.; Friberg, H.; Kubartova, A.; Schenck, J.; Strid, Y.; Stenlid, J.; Brandström-Durling, M.; Clemmensen, K.E. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *82*, 666–677.
34. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, W.J. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*; Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1990.
35. Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; Van Den Beek, M.; Bouvier, D.; Čech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; Grüning, B.A. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W537–W544.

36. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
37. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581.
38. Aronesty, E. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma. J.* **2013**, *7*, 1–8.
39. Gordon, A.; Hannon, G. FASTQ/A Short-Reads Pre-Processing Tools. 2010. Available online: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/.
40. Shen, W.; Le, S.; Li, Y.; Hu, F. SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163962.
41. Bengtsson-Palme, J.; Ryberg, M.; Hartmann, M.; Branco, S.; Wang, Z.; Godhe, A.; De Wit, P.; Sanchez-Garcia, M.; Ebersberger, I.; de Sousa, F. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* **2013**, *4*, 914–919.
42. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584.
43. Wickham, H. *Elegant Graphics for Data Analysis (ggplot2)*; Springer: New York, NY, USA, 2009.
44. Venables, W.; Ripley, B.; Isbn, S. *Statistics Complements to Modern Applied Statistics with S by W.N. Venables and B.D. Ripley*, 4th ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2002.
45. Barton, K. MuMIn: Multi-model inference. R package version 0.12. 2/r18. 2009. Available online: <http://R-Forge.R-project.org/projects/mumin>.
46. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Kindt, R.; Legendre, P.; O'hara, R.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; Wagner, H. Vegan: Community ecology package. R package version 1.17-4. Available online: <http://cran.r-project.org>.
47. Smith, M. Ternary: An R package to generate ternary plots. *Zenodo* **2017**.
48. Dufrêne, M.; Legendre, P. Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol. Monogr.* **1997**, *67*, 345–366.
49. Anderson, M.J.; Walsh, D.C. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecol. Monogr.* **2013**, *83*, 557–574.

50. Ricklefs, R.E. Environmental heterogeneity and plant species diversity: A hypothesis. *Am. Nat.* **1977**, *111*, 376–381.
51. Shmida, A.; Wilson, M.V. Biological determinants of species diversity. *J. Biogeogr.* **1985**, *12*, 1–20.
52. Shorrocks, B.; Sevenster, J.G. Explaining local species diversity. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **1995**, *260*, 305–309.
53. Asemaninejad, A.; Thorn, R.G.; Lindo, Z. Vertical distribution of fungi in hollows and hummocks of boreal peatlands. *Fungal Ecol.* **2017**, *27*, 59–68.
54. Clemmensen, K.E.; Finlay, R.D.; Dahlberg, A.; Stenlid, J.; Wardle, D.A.; Lindahl, B.D. Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. *New Phytol.* **2015**, *205*, 1525–1536.
55. Männistö, M.; Vuosku, J.; Stark, S.; Saravesi, K.; Suokas, M.; Markkola, A.; Martz, F.; Rautio, P. Bacterial and fungal communities in boreal forest soil are insensitive to changes in snow cover conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, fiy123.
56. Geml, J.; Laursen, G.A.; Herriott, I.C.; McFarland, J.M.; Booth, M.G.; Lennon, N.; Chad Nusbaum, H.; Lee Taylor, D. Phylogenetic and ecological analyses of soil and sporocarp DNA sequences reveal high diversity and strong habitat partitioning in the boreal ectomycorrhizal genus *Russula* (*Russulales*; *Basidiomycota*). *New Phytol.* **2010**, *187*, 494–507.
57. Mucha, J.; Peay, K.G.; Smith, D.P.; Reich, P.B.; Stefański, A.; Hobbie, S.E. Effect of simulated climate warming on the ectomycorrhizal fungal community of boreal and temperate host species growing near their shared ecotonal range limits. *Microb. Ecol.* **2018**, *75*, 348–363.
58. Kauserud, H.; Mathiesen, C.; Ohlson, M. High diversity of fungi associated with living parts of boreal forest bryophytes. *Botany* **2008**, *86*, 1326–1333.
59. Brabcová, V.; Nováková, M.; Davidová, A.; Baldrian, P. Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytol.* **2016**, *210*, 1369–1381.
60. Cline, L.C.; Huggins, J.A.; Hobbie, S.E.; Kennedy, P.G. Organic nitrogen addition suppresses fungal richness and alters community composition in temperate forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *125*, 222–230.
61. Goldmann, K.; Schöning, I.; Buscot, F.; Wubet, T. Forest management type influences diversity and community composition of soil fungi across temperate forest ecosystems. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1300.

62. Morrison, E.W.; Frey, S.D.; Sadowsky, J.J.; van Diepen, L.T.; Thomas, W.K.; Pringle, A. Chronic nitrogen additions fundamentally restructure the soil fungal community in a temperate forest. *Fungal Ecol.* **2016**, *23*, 48–57.
63. Truong, C.; Mujic, A.B.; Healy, R.; Kuhar, F.; Furci, G.; Torres, D.; Niskanen, T.; Sandoval-Leiva, P.A.; Fernández, N.; Escobar, J.M. How to know the fungi: Combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytol.* **2017**, *214*, 913–919.
64. Maheswari, S.; Rajagopal, K. Biodiversity of endophytic fungi in *Kigelia pinnata* during two different seasons. *Curr. Sci.* **2013**, *104*, 515–518.
65. Wallander, H.; Nilsson, L.O.; Hagerberg, D.; Bååth, E. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol.* **2001**, *151*, 753–760.
66. Nilsson, M.; Rölcker, C. Seasonal variation of active fungal mycelium in an oligotrophic *Sphagnum* mire, northern Sweden. *Soil Biol. Biochem.* **1992**, *24*, 795–804.
67. Nagati, M.; Roy, M.; Manzi, S.; Richard, F.; Desrochers, A.; Gardes, M.; Bergeron, Y. Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal forest. *Plant Soil* **2018**, *432*, 345–357.
68. Schmidt, P.A.; Balint, M.; Greshake, B.; Bandow, C.; Rombke, J.; Schmitt, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *65*, 128–132, doi:10.1016/j.soilbio.2013.05.014.
69. Seifert, K.A. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Resour.* **2009**, *9* (Suppl. s1), 83–89, doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x.
70. Xu, J. Fungal DNA barcoding. *Genome* **2016**, *59*, 913–932.
71. Thormann, M.N.; Currah, R.S.; Bayley, S.E. The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 204–211.
72. Fenton, N.J.; Bergeron, Y.; Paré, D. Decomposition rates of bryophytes in managed boreal forests: Influence of bryophyte species and forest harvesting. *Plant Soil* **2010**, *336*, 499–508.
73. Verhoeven, J.; Liefveld, W. The ecological significance of organochemical compounds in *Sphagnum*. *Acta Bot. Neerl.* **1997**, *46*, 117–130.
74. Rice, A.V.; Tsuneda, A.; Currah, R.S. In vitro decomposition of *Sphagnum* by some microfungi resembles white rot of wood. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *56*, 372–382.

75. Thormann, M.N. Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Can. J. Soil Sci.* **2006**, *86*, 281–293.
76. Hågvar, S. Primary succession of springtails (*Collembola*) in a Norwegian glacier foreland. *Arct. Antarct. Alp. Res.* **2010**, *42*, 422–429.
77. Raffl, C.; Mallaun, M.; Mayer, R.; Erschbamer, B. Vegetation succession pattern and diversity changes in a glacier valley, Central Alps, Austria. *Arct. Antarct. Alp. Res.* **2006**, *38*, 421–428.
78. Dejene, T.; Oria-de-Rueda, J.A.; Martín-Pinto, P. Fungal diversity and succession following stand development in *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. plantations in Ethiopia. *For. Ecol. Manag.* **2017**, *395*, 9–18.
79. Kernaghan, G. Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* **2005**, *49*, 511–520.
80. Blaallid, R.; Carlsen, T.; Kumar, S.; Halvorsen, R.; Ugland, K.I.; Fontana, G.; Kauserud, H. Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol.* **2012**, *21*, 1897–1908.
81. Zumsteg, A.; Luster, J.; Göransson, H.; Smittenberg, R.H.; Brunner, I.; Bernasconi, S.M.; Zeyer, J.; Frey, B. Bacterial, archaeal and fungal succession in the forefield of a receding glacier. *Microb. Ecol.* **2012**, *63*, 552–564.
82. Twieg, B.D.; Durall, D.M.; Simard, S.W. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytol.* **2007**, *176*, 437–447.
83. Hiiesalu, I.; Bahram, M.; Tedersoo, L. Plant species richness and productivity determine the diversity of soil fungal guilds in temperate coniferous forest and bog habitats. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 4846–4858.
84. Boeraeve, M.; Honnay, O.; Jacquemyn, H. Effects of host species, environmental filtering and forest age on community assembly of ectomycorrhizal fungi in fragmented forests. *Fungal Ecol.* **2018**, *36*, 89–98.
85. He, L.; Chen, J.M.; Pan, Y.; Birdsey, R.; Kattge, J. Relationships between net primary productivity and forest stand age in US forests. *Glob. Biogeochem. Cycles* **2012**, *26*, doi:10.1029/2010GB003942.
86. Ryan, M.; Binkley, D.; Fownes, J.H. Age-related decline in forest productivity: Pattern and process. *Adv. Ecol. Res.* **1997**, *27*, 213–262.
87. Rożek, K.; Rola, K.; Błaszowski, J.; Zubek, S. Associations of root-inhabiting fungi with herbaceous plant species of temperate forests in relation to soil chemical properties. *Sci. Total Environ.* **2019**, *649*, 1573–1579.

88. Veresoglou, S.D.; Wulf, M.; Rillig, M.C. Facilitation between woody and herbaceous plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi in temperate European forests. *Ecol. Evol.* **2017**, *7*, 1181–1189.
89. Öpik, M.; Moora, M.; Zobel, M.; Saks, Ü.; Wheatley, R.; Wright, F.; Daniell, T. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytol.* **2008**, *179*, 867–876.
90. Urbanová, M.; Šnajdr, J.; Baldrian, P. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *84*, 53–64.
91. Lekberg, Y.; Koide, R.T.; Rohr, J.R.; Aldrich-wolfe, L.; Morton, J.B. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J. Ecol.* **2007**, *95*, 95–105.
92. Coleman, D.C.; Callahan, M.A.; Crossley, D., Jr. *Fundamentals of Soil Ecology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017.
93. Bushby, H.; Marshall, K. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *Microbiology* **1977**, *99*, 19–27.
94. Bitton, G.; Henis, Y.; Lahav, N. Influence of clay minerals, humic acid and bacterial capsular polysaccharide on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to drying and heating in soils. *Plant Soil* **1976**, *45*, 65–74.
95. Stotzky, G.; Rem, L. Influence of clay minerals on microorganisms: I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1966**, *12*, 547–563.
96. Chase, J.M.; Leibold, M.A. *Ecological Niches: Linking Classical and Contemporary Approaches*; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 2003.
97. Chau, J.F.; Bagtzoglou, A.C.; Willig, M.R. The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environ. Forensics* **2011**, *12*, 333–341.
98. McGuire, K.L.; Fierer, N.; Bateman, C.; Treseder, K.K.; Turner, B.L. Fungal community composition in neotropical rain forests: The influence of tree diversity and precipitation. *Microb. Ecol.* **2012**, *63*, 804–812.
99. Talley, S.M.; Coley, P.D.; Kursar, T.A. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecol.* **2002**, *2*, 7.
100. Glassman, S.I.; Wang, I.J.; Bruns, T.D. Environmental filtering by pH and soil nutrients drives community assembly in fungi at fine spatial scales. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 6960–6973.

101. Köster, K.; Berninger, F.; Lindén, A.; Köster, E.; Pumpanen, J. Recovery in fungal biomass is related to decrease in soil organic matter turnover time in a boreal fire chronosequence. *Geoderma* **2014**, *235*, 74–82.
102. Sun, H.; Santalahti, M.; Pumpanen, J.; Köster, K.; Berninger, F.; Raffaello, T.; Jumpponen, A.; Asiegbu, F.O.; Heinonsalo, J. Fungal community shifts in structure and function across a boreal forest fire chronosequence. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 7869–7880.
103. Gock, M.A.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Poulos, P.G. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *81*, 11–19.
104. Jackson, A.; Whipps, J.; Lynch, J. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *7*, 494–501.
105. Yamanaka, T. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. *Mycologia* **2003**, *95*, 584–589.
106. Rousk, J.; Bååth, E.; Brookes, P.C.; Lauber, C.L.; Lozupone, C.; Caporaso, J.G.; Knight, R.; Fierer, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* **2010**, *4*, 1340.
107. Rousk, J.; Brookes, P.C.; Bååth, E. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biol. Biochem.* **2010**, *42*, 926–934.
108. Thomas, G.W. Soil pH and soil acidity. *Methods Soil Anal.* **1996**, *3*, 475–490.
109. Finzi, A.C.; Canham, C.D.; Van Breemen, N. Canopy tree–soil interactions within temperate forests: Species effects on pH and cations. *Ecol. Appl.* **1998**, *8*, 447–454.
110. Pernes-Debuyser, A.; Tessier, D. Influence du pH sur les propriétés des sols : l'essai de longue durée des 42 parcelles à Versailles. *Rev. des Sci. de l'eau J. Water Sci.* **2002**, *15*, 27–39.
111. Hawkes, C.V.; Kivlin, S.N.; Rocca, J.D.; Huguet, V.; Thomsen, M.A.; Suttle, K.B. Fungal community responses to precipitation. *Glob. Chang. Biol.* **2011**, *17*, 1637–1645.
112. O'Dell, T.E.; Ammirati, J.F.; Schreiner, E.G. Species richness and abundance of ectomycorrhizal basidiomycete sporocarps on a moisture gradient in the *Tsuga heterophylla* zone. *Can. J. Bot.* **2000**, *77*, 1699–1711.

113. Hernández-Rodríguez, M.; Oria-de-Rueda, J.A.; Martín-Pinto, P. Post-fire fungal succession in a Mediterranean ecosystem dominated by *Cistus ladanifer* L. *For. Ecol. Manag.* **2013**, *289*, 48–57.
114. Smith, J.; Molina, R.; Huso, M.M.; Luoma, D.; McKay, D.; Castellano, M.; Lebel, T.; Valachovic, Y. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Can. J. Bot.* **2002**, *80*, 186–204.
115. Last, F.; Dighton, J.; Mason, P. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends Ecol. Evol.* **1987**, *2*, 157–161.
116. Jumpponen, A.; Trappe, J.M.; Cázares, E. Occurrence of ectomycorrhizal fungi on the forefront of retreating Lyman Glacier (Washington, USA) in relation to time since deglaciation. *Mycorrhiza* **2002**, *12*, 43–49.
117. Nara, K.; Nakaya, H.; Hogetsu, T. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol.* **2003**, *158*, 193–206.
118. Buckley, L.B.; Jetz, W. Linking global turnover of species and environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17836–17841.
119. Maynard, D.S.; Bradford, M.A.; Covey, K.R.; Lindner, D.; Glaeser, J.; Talbert, D.A.; Tinker, P.J.; Walker, D.M.; Crowther, T.W. Consistent trade-offs in fungal trait expression across broad spatial scales. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 846.

CHAPITRE III

COMBINING NEXT GENERATION SEQUENCING DATA AND ABIOTIC VARIABLES FOR MODELING AND PREDICT FUNGAL SPECIES DISTRIBUTION

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui est en préparation pour soumission sous forme de courte communication pour la revue *Journal of fungi*. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs. La référence de cet article sera la suivante :

Laperriere G, Chagnon P-L, Bisson D, Maire V and Germain H. Combining next generation sequencing data and abiotic variables for modeling and predict fungal species distribution.

3.1 Contributions des auteurs

Genevieve Laperriere a effectué, en majorité, la conception de l'étude, l'échantillonnage terrain, la réalisation des expérimentations, l'analyse de données ainsi que l'écriture du manuscrit. Pierre-Luc Chagnon, par son expertise, a grandement contribué à l'analyse des données ainsi qu'à la révision et l'écriture du manuscrit. Danny Bisson a contribué, par son expertise en géomatique, aux choix des sites d'échantillonnage, à la création des cartes de potentiel et comme support technique. Vincent Maire a participé à l'échantillonnage terrain, a contribué par son expertise aux modèles de distribution des espèces ainsi qu'à la révision et l'écriture du manuscrit. Hugo Germain est le directeur de recherche du laboratoire. Il a supervisé le projet, participé à l'échantillonnage terrain, contribué au design expérimental, a révisé et participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu les subventions pour l'étude.

3.2 Résumé de l'article (français)

Les champignons forestiers comestibles apportent de nombreux bénéfices aux populations en étant une source d'alimentation ainsi qu'une source de revenu. Certaines espèces sont très recherchées sur le marché et possèdent un fort potentiel commercial dû à leur comestibilité et leur bon goût. D'autres champignons, en contrepartie, sont toxiques ou mortels et doivent être répertoriés. La culture en serre pour de nombreux champignons forestiers est difficile ou impossible à cause des relations complexes entre les champignons et leur habitat. Ainsi, la cueillette en forêt reste le moyen principal d'obtenir la ressource. Afin de mieux développer l'industrie et la commercialisation des espèces fongiques d'intérêts (comestibles ou non), il importe de connaître et de prévoir leur localisation. Malheureusement, la distribution et les habitats préférentiels pour de nombreux champignons forestiers sont méconnus ou mal décrits. Dans le but d'améliorer le développement de l'industrie des champignons forestiers, les objectifs de cette étude visaient à (1) identifier des variables abiotiques étant de forts prédicteurs d'une espèce ciblée, (2) prédire la distribution de l'espèce et (3) générer des cartes de probabilité de présence afin de mieux cibler des sites potentiels de cueillette. Pour ce faire, nous avons utilisé des données de séquençage obtenues sur des échantillons de sol récoltés à travers la forêt tempérée et boréale de la province du Québec. Les données de fréquence et les variables abiotiques du peuplement ont été appliquées dans des modèles linéaires généralisés (GLMs) afin de générer des modèles de prédiction de distribution pour une espèce ciblée. Le modèle a ensuite été appliqué sur des bases de données écoforestières afin de générer des cartes de potentiel de présence (entre 0 et 1). L'espèce *Amanita muscaria* a été utilisée comme exemple dans cet article afin de démontrer une méthodologie permettant de générer des modèles de probabilité de présence à partir de données écologiques, géomatiques et d'ADN. Cette méthodologie pourra ensuite être applicable sur d'autres espèces notamment sur des espèces d'intérêts comestibles. En tout, 131 072 combinaisons possibles de modèles ont été générées à partir des données de fréquence d'*A. muscaria* avec les 17 variables abiotiques qui caractérisaient les peuplements. Parmi les combinaisons possibles, un modèle a été sélectionné en fonction de plusieurs critères et les précipitations moyennes pendant la saison de croissance, le couvert en mousse et le pH du sol ont été

identifiées comme étant de forts prédicteurs pour l'espèce. L'application du modèle sur les bases de données écoforestières a permis de générer des cartes indiquant la probabilité de présence de l'espèce à travers les polygones forestiers d'une région. De nombreuses zones en roses et rouges indiquant une probabilité de moyenne à très élevée (0.4-1.0) que l'espèce soit présente ont été identifiées dans différentes régions. Toutefois ces données ne représentent pas la probabilité de production de sporocarpes, mais sont tout de même un outil efficace pour localiser les sites potentiels de cueillette et permettent d'éliminer rapidement des zones non propices à la présence d'une espèce.

3.3 Article complet (anglais): Combining next generation sequencing data and abiotic variables for modeling and predict fungal species distribution

Abstract

Wild edible mushrooms provide many benefits to humans, either as part of their diet or as a source of income. Some species are in fact highly demanded and have a strong commercial value. Cultivation is typically difficult or impossible because of the complex and intricate dependence of these fungi with specific components of their environments (e.g., ectomycorrhizal hosts). Wild harvesting is thus the only way forward to commercialize these species. To improve the efficiency of this harvesting process, there is a strong incentive for developing predictive models of these species' occurrence in the environment, as related to various biotic/abiotic predictors. Likewise, toxic/deadly mushrooms are also key organisms for which more knowledge on biogeography would be particularly useful, here to provide guidance to amateur naturalists that could be at risk to confound edible and toxic species looking alike. In order to better develop the industry and the market of wild fungal species (edible or not), it is important to know and predict their localization. Unfortunately, the distribution and preferred habitats for many wild fungal species are poorly described. In order to improve the development of the wild fungi industry, the objectives of this study were to (1) identify strong predictors of a target species, (2) predict the distribution and (3) generate maps of potential localization in order to better identify potential sites. In this study, we use *Amanita muscaria* as a model species to validate the approach. We used next generation sequencing to detect fungal mycelium from soil samples collected across the temperate and boreal Quebec forest. We also collected soil and stand properties at each site to predict fungal occurrence based on environmental parameters. We then used this trained model to map potential occurrences of *Amanita muscaria* through Quebec forests using the environmental data from the forest inventory database. Although these data do not necessarily mirror the probability of sporocarp production, which is highly dependent on local and short-term meteorological factors, they remain a promising tool for anticipating sites of occurrence for species of interest.

Our work is also a timely contribution to the fungal species distribution modelling, which is crucial in a changing world.

Introduction

Wild mushrooms provide major benefits to the populations, particularly by contributing to the diet and as a source of income [1]. Some mushrooms like *Tricholoma matsutake* and *Morchella* spp. [1,2] have a commercial interest due to taste and/or production of bioproducts such as antioxidants [3]. Other fungal species (e.g., *Amanita muscaria*, *Amanita virosa*) are toxic or deadly and their localization need to be recorded [4,5]. Most of the wild edible mushrooms are ectomycorrhizal fungi [6,7]. Their complex dependence upon a host plant for carbon nutrition often makes their culture difficult or impossible: in such context, the only way to obtain them is through harvesting in the wild. In order to better develop the industry and commercialization of economically important macromycetes, or to provide guidance into potential risks of encountering toxic/deadly species, making progress into the modelling of fungal species' distribution is pivotal. Ideally, precise maps predicting the occurrence probabilities for species of interest could be developed. Right now, a weakness of existing datasets is that they rely on sporocarp surveys, which are not ideal, because the production of fruiting bodies in fungi can be stochastic and show interannual variability, despite the presence of the fungus belowground as vegetative biomass. In this view, it could be desirable to focus on molecular rather than sporocarp detection of fungal taxa to develop predictive species distribution models (SDMs).

Many modeling methods have been developed to produce SDMs. These can be classified as profile (BIOCLIM, DOMAIN) [9,10], regression (generalised linear or additive models) [11] and machine learning methods (Random Forest, MaxEnt) [12,13]. A commonly used method of species distribution modeling is generalized linear models (GLMs), an extension of linear models that allows flexibility in response variable distribution, in variance structure, and in the link specified between the response and the explanatory variables, which is fixed to be an identity link in regular linear regressions

[14]. As such, GLMs is a more flexible tool for analyzing ecological relationships [15], and has been widely adopted to model species distributions for plants [16], animals [17], birds [18] and also fungi [19].

In this study, we used generalized linear models (GLMs) to predict the distribution of a wild macromycete, *Amanita muscaria*, based on its presence in environmental DNA (eDNA) samples. The result is maps which provide likelihood of mycelium occurrence in the soil, a first step towards having a map that would predict mushroom occurrence. Sequencing of eDNA, provided information to rapidly and extensively estimate richness and composition of targeted organisms without the need to see the species, but through the presence of their DNA in the environment [20-22]. For fungi, eDNA from soil sampled is generally used to estimate their diversity [23,24]. On the other hand for modeling distribution of fungal species, occurrence data commonly comes from herbarium [19] or recent surveys and observations [25,26]. Our objective was to explore the potential of next generation sequencing data for modeling and predicting wild macromycete fungal species distribution using generalized linear models (GLMs) in order to (1) identify abiotic drivers of a target fungal species, (2) predict its distribution and (3) construct maps of their potential distribution. The species *Amanita muscaria* was used as an example in this article to show the methodology for generating probability of occurrence models from ecological, geomatics and sequencing data. This study modeling the distribution of *Amanita muscaria*, a toxic ectomycorrhizal fungus, thus stands as a proof of concept showing the potential of next-generation sequencing in assisting fungal species distribution modeling.

Materials and methods

Sites selection, soil sampling and characterization

The total description of site selection, soil sampling and characterization is described in Laperriere et al. (2019) [27]. Briefly 262 sites were sampled in three different regions in the province of Quebec (Canada), Abitibi-Témiscamingue (AT),

Haute-Mauricie (HM) and in Mauricie (MAU). We used a forest inventory database composed of 75 abiotic variables and 33 000 stands, released in 2009, through the Ministry of Forest and Parks of the province of Quebec to identify and locate sites. Sites were sampled between June and September 2017. On each site an area of 400 m² (20m x 20m) was delimited and 6 soil cores of 20 cm depth every 5m along the transects were taken. Subsample for DNA analysis was stored at -20 °C and the rest of the soil samples were sieved and stored at different temperature for other analysis. Some site characteristics were already known with the forest inventory database such as stand age, dominant tree species, level of drainage and surficial deposit. In addition, we measured coverage percentage of trees, shrubs (DBH < 9 cm), herbaceous, mosses and lichens (between 0 to 100%) and also thickness of litter layer and organic layer (humus), both in centimeter (cm). Using georeferenced information from each site, we extracted historical climatic data ranging from 1981 to 2010, from the site of Ministry of the Environment and Climate Change of Quebec (<https://www.donneesquebec.ca/>). Mean temperature (°C) during the growing season and average precipitation (mm) during the growing season were used as climatic data. Growing season was defined as the period between the three first consecutive frost-free days (min. T° > 0 °C in spring) and the first three consecutive days with frost (min. T° < 0 °C in the fall).

Soil analysis, DNA extraction, amplification and sequencing

All details are available in the manuscript Laperriere et al (2019) [27]. Globally, for soil analyses part of the soil for each site was dried to measure pH (hydrogen potential) and Eh (redox potential). Eh was measured following the method of Husson et al. [28] and standardized for a pH of 7. The pH was taken immediately after the Eh measurement. Content (%) of organic matter (OM), silt, sand and clay was also measured. Soil DNA was extracted with the DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Montreal, QC, CAN) according to the manufacturer's instructions. 200 µl of 100 µM ammonium aluminium sulfate (AlNH₄(SO₄)₂) was added, as an additional step, in the column to remove inhibitors. DNA was eluted in 100 µl. We amplified the ITS2 region with the universal fungal primers fITS7 and ITS4 with a CS1

(ACACTGACGACATGGTTCTACA) and CS2 (TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT) tag added at the 5' extremities [29,30]. Three different annealing temperatures (48 °C, 51 °C and 58 °C) were used for each PCR reactions and positive PCR from the same site were pooled (3 PCR x 256 sites) and sent for Illumina MiSeq PE 300 sequencing following the procedures of Quebec Genome Innovation Center of McGill University (Montreal, QC, CAN).

Statistical analyses

Bioinformatic analyses were conducted as described in Laperriere et al. (2019) [27]. From the complete dataset, occurrences of *Amanita muscaria* were retrieved to construct a binary matrix describing the distribution of this fungus (presence/absence) into our different sampling sites. *Amanita muscaria* probability of occurrence was modeled as a function of our 17 abiotic explanatory variables (Supplementary material Table S1). All statistical analyses were coded in R [31]. Continuous numerical variables were standardized prior to analysis. Percentage of sand was excluded from the analysis because of its non-independence from clay and silt content and mean temperature during the growing season was removed because of high collinearity with average precipitation during the growing season. Generalized linear model (GLM) with binomial family error distribution (i.e., logit regression) was used to model *Amanita muscaria* distribution and a set of all possible candidate models was generated using MuMIn R packages based on the function *dredge* [32]. Selected variables from these two models were running again without standardizing data and results were applied on the equation (1) where γ corresponded to the response variable (*A. muscaria* presence), α was the estimated regression coefficients of each of the included explanatory variables, χ value obtained in the field for the explanatory variable and β corresponded to the intercept estimated regression coefficients.

$$\gamma = \frac{e^{\alpha\chi + \beta}}{1 + e^{\alpha\chi + \beta}} \quad (1)$$

Creation of maps for potential distribution

We extrapolated our logit regression model generated by the GLMs on the forest inventory database composed of 75 abiotic variables and 33 000 stands, released in 2009, through the Ministry of Forest and Parks of the province of Quebec. In this database we also added the climatic data ranging from 1981 to 2010, from the site of Ministry of the Environment and Climate Change of Quebec. The formula was applied for each forest polygon. The final result (between 0 and 1) was mapped using quantitative classification at equal intervals. Five potential classes were used to represent probability of occurrence for *A. muscaria*: 0 to 0.2 (very low); 0.2 to 0.4 (low) ; 0.4 to 0.6 (medium) ; 0.6 to 0.8 (high) ; 0.8 to 1.0 (very high).

Results

Results from GLMs

Amanita muscaria was found in 60 sampled sites out of 240 sites analyzed (Supplementary material Table S1). Starting from a GLM that included all the abiotic variables, we generated 131 072 possible candidate models with *dredge* function. We ranked them first based on their corrected Akaike information criterion value (AICc). The lowest AICc model obtained had a value of 237.82 (model A) and included the variables stand age, average precipitation, lichen cover, moss cover, soil pH and shrub cover (first 20 model ranked by their AICc criteria are shown in supplementary material Table S2). We again ranked all possible candidate models by using Bayesian information criteria (BIC). The result obtained for the lowest BIC (254.0) (model B) included fewer variables such as average precipitation, moss cover and soil pH (first 20 model ranked by their BIC criteria are shown in Table S3). Selected variables from these two models were running again without standardizing data and results are summarized in Table 1. The proportion of variation explained (null deviance – residuals deviance/null deviance) from model A was 17% instead of 14% for model B. AICc value from these two models were very similar, within the usual limit of two AICc units to consider models with significantly different fit. We selected the model B to apply it in

the construct of maps for potential distribution of *Amanita muscaria* mycelium, because z-value (regression coefficient divided by its standard error) for all included variables were statistically significant ($\Pr(>|z|) < 0.05$) (Table 3.1).

Table 1
GLM results (with non standardized variables) for model A and B

Model A			
Variables	Estimate Coefficients	Z value	Pr(> z)
Intercept	-6.1680	-2.445	0.01
Precipitation	0.0067	2.245	0.02
Moss	-0.1839	-1.843	0.07
pH	0.9783	3.205	0.001
Age	-1.2969	-1.661	0.10
Lichen	-0.5666	-1.703	0.09
Shrub	-0.2643	-1.698	0.09
Residual deviance	223.34	-	-
Null deviance	269.92	-	-
AICc	237.34	-	-
Model B			
Variables	Estimates Coefficients	Z value	Pr(> z)
Intercept	-8.7566	-3.928	8.57 ^e -5
Precipitation	0.0091	3.177	0.001
Moss	-0.2372	2.471	0.01
pH	0.7893	2.809	0.004
Residual deviance	232.12	-	-
Null deviance	269.92	-	-
AICc	240.12	-	-

Maps of potential distribution

GLM results from model B was applied on equation (1) as β corresponded to the intercept estimated regression coefficients (-8.7566) and α the estimated regression coefficients of each of the included variables (0.0091 (average precipitation) -0.2372 (moss cover) + 0.7893 (soil pH)). An inverse logit function was applied to obtain the γ value corresponding to the probability of presence between 0 to 1. The equation was applied on the forest inventory database for each forest polygon in the targeted region and mapped. Figure 1 and figure 2 showed probability of presence for *A. muscaria* in the region of Abitibi-Témiscamingue (around Rouyn-Noranda, Québec, Canada) (Figure 1) and Haute-Mauricie (around Lac-Édouard, Québec, Canada) (Figure 2). We see in figure 1 several zones (forest polygon) in pink indicating a probability of presence of *A. muscaria* from 0.4 to 0.6 but, in the majority of the forest polygon the probability is lower or very low (Figure 1). In the Haute-Mauricie, we identified few forest polygons in red indicating high probability (0.6 to 0.8) (Figure 2). These areas could be a good place to investigate the search of this species or to be alert to its presence.

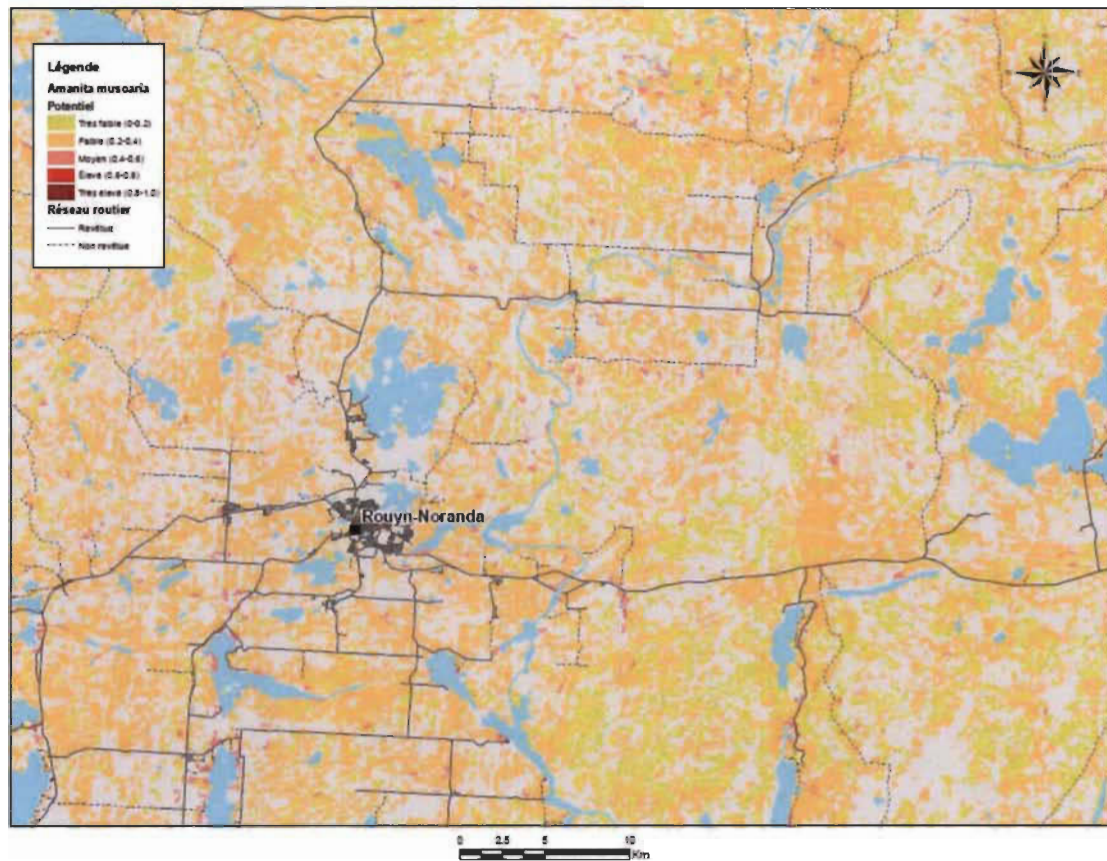


Figure 1 Map of potential distribution of *A. muscaria* in the region of Abitibi-Témiscamingue around Rouyn-Noranda (Québec, Canada). Each colored zone corresponds to a forest polygon and colors represent a probability of presence of the species; green (0 to 0.2), orange (0.2-0.4), pink (0.4-0.6), red (0.6-0.8) and dark red (0.8-1.0).

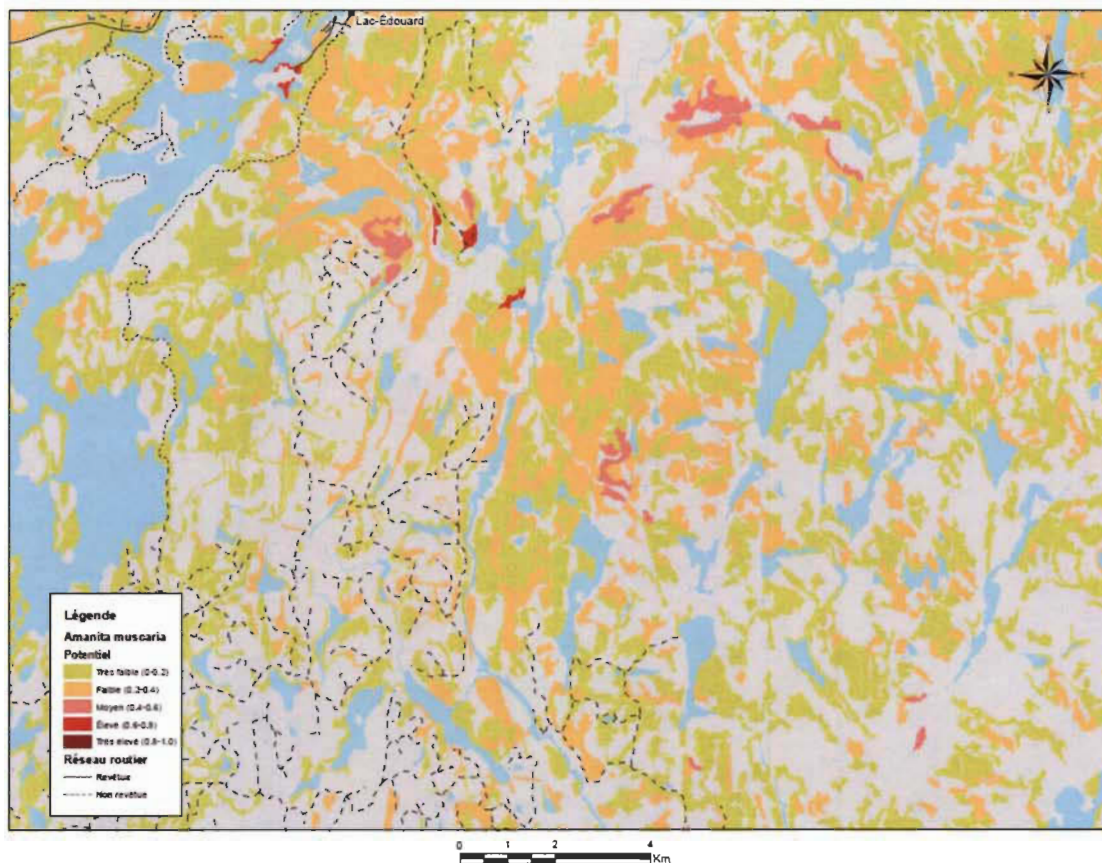


Figure 2 Map of potential distribution of *A. muscaria* in the region of Haute-Mauricie around Lac Édouard (Québec, Canada). Each colored zone correspond to a forest polygon and colors represent the probability of presence of the species; green (0 to 0.2), orange (0.2-0.4), pink (0.4-0.6), red (0.6-0.8) and dark red (0.8-1.0).

Conclusions

Currently species distribution modeling use occurrence data from herbarium, observations or recent surveys [19,25-26]. In the case of fungi, sporocarp surveys can bias frequency data of a species because of many environmental variables that can affect sporocarp production. The method describes here offer the potential to use frequency data from the DNA mycelium present in the soil without the need to see the fungal species and with less time consuming. Most of the forest polygon showed a low probability of occurrence (0-0.4) and thus few optimal stands were identified (0.6-1) (Figure 1 and 2) but our results is comparable to other study predicting fungal

distribution and where optimal stands were rare [26]. Relation of fungi with their environment is complexe and our model explain 17% of the variation (Table 1). The variation explained by the GLMs can vary according to the distribution of the species. Distribution is modelled more precisely for specialist species with a restricted distribution than for widespread and generalist species [33,34]. Wolland et al. 2008 also showed that the extent of the study area and the frequency of the species influence the fraction of variation explained by the model and the number of variables includes [19]. *Amanita muscaria* is a largely distributed species in Quebec forests and commonly found in several habitat [7].

This method provides information and indication about potential of a stand to contain the target species and unsuitable or less likely stands can be eliminated to save time and money. It is a begining to provide accessible and useful tools for mushroom pickers to facilate localization of potential harvest sites in the case where the model could be applied on edible species. However, these data do not represent the probability of sporocarp production but are an effective tool for locating potential sites and can be used to quickly eliminate areas with a low probability of occurrence [33, 34].

References

1. Boa, E. *Champignons comestibles sauvages: vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations*; Food & Agriculture Org: Rome (Italie), 2006; pp. 157.
2. Pilz, D.; Molina, R. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* **2002**, *155*, 3–16.
3. Tsai, S.-Y.; Tsai, H.-L.; Mau, J.-L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT-Food Science and Technology* **2007**, *40*, 1392–1402.
4. Faulstich, H.; Buku, A.; Bodenmueller, H.; Wieland, T. Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms. *Biochemistry* **1980**, *19*, 3334–3343.
5. Michelot, D.; Melendez-Howell, L.M. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological research* **2003**, *107*, 131–146.

6. Fortin, J.A.; Plenchette, C.; Piché, Y. *Les mycorhizes: l'essor de la nouvelle révolution verte*; Quae: 2016.
7. McNeil, R. *Le grand livre des champignons du Québec et de l'Est du Canada*; Éditions M. Quintin: 2006.
8. Franklin, J. *Mapping species distributions: spatial inference and prediction*; Cambridge University Press: 2010.
9. Booth, T.H.; Nix, H.A.; Busby, J.R.; Hutchinson, M.F. BIOCLIM: the first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MAXENT studies. *Diversity and Distributions* **2014**, *20*, 1–9.
10. Carpenter, G.; Gillison, A.; Winter, J. DOMAIN: a flexible modelling procedure for mapping potential distributions of plants and animals. *Biodiversity & Conservation* **1993**, *2*, 667–680.
11. Guisan, A.; Edwards Jr, T.C.; Hastie, T. Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: setting the scene. *Ecological modelling* **2002**, *157*, 89–100.
12. Breiman, L. Random forests. *Machine learning* **2001**, *45*, 5–32.
13. Phillips, S.J.; Anderson, R.P.; Schapire, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling* **2006**, *190*, 231–259.
14. Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. **2009**. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer Science & Business Media.
15. Austin, M. Models for the analysis of species' response to environmental gradients. In *Theory and models in vegetation science*, Springer: 1987; pp. 35–45.
16. Guisan, A.; Theurillat, J.P.; Kienast, F. Predicting the potential distribution of plant species in an alpine environment. *Journal of Vegetation Science* **1998**, *9*, 65–74.
17. Zimmermann, F.; Breitenmoser, U. A distribution model for the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the Jura Mountains, Switzerland. *Predicting species occurrences: issues of accuracy and scale* **2002**, 653–659.
18. Manel, S.; Dias, J.-M.; Ormerod, S.J. Comparing discriminant analysis, neural networks and logistic regression for predicting species distributions: a case study with a Himalayan river bird. *Ecological modelling* **1999**, *120*, 337–347.
19. Wollan, A.K.; Bakkestuen, V.; Kauserud, H.; Gulden, G.; Halvorsen, R. Modelling and predicting fungal distribution patterns using herbarium data. *Journal of Biogeography* **2008**, *35*, 2298–2310.

20. Hajibabaei, M.; Singer, G.A.; Hebert, P.D.; Hickey, D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in genetics: TIG* **2007**, *23*, 167–172, doi:10.1016/j.tig.2007.02.001.
21. Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *P Roy Soc B-Biol Sci* **2003**, *270*, 313–321, doi:10.1098/rspb.2002.2218.
22. Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Brochmann, C.; Willerslev, E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol* **2012**, *21*, 2045–2050, doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x.
23. Schmidt, P.A.; Balint, M.; Greshake, B.; Bandow, C.; Rombke, J.; Schmitt, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol Biochem* **2013**, *65*, 128–132, doi:10.1016/j.soilbio.2013.05.014.
24. Tedersoo, L.; Bahram, M.; Põlme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N.S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L.V.; Vasco-Palacios, A.M.; Thu, P.Q.; Suija, A. Global diversity and geography of soil fungi. *science* **2014**, *346*, 1256688.
25. Torres, M.L. A Presence-Only Species Distribution Model Comparison Predicting the Distribution of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Murray State University, 2017.
26. Yuan, H.-S.; Wei, Y.-L.; Wang, X.-G. Maxent modeling for predicting the potential distribution of Sanghuang, an important group of medicinal fungi in China. *Fungal Ecology* **2015**, *17*, 140–145.
27. Laperriere, G.; Chagnon, P.-L.; Giguère-Tremblay, R.; Morneau, A.; Bisson, D.; Maire, V.; Germain, H. Estimation of Fungal Diversity and Identification of Major Abiotic Drivers Influencing Fungal Richness and Communities in Northern Temperate and Boreal Quebec Forests. *Forests* **2019**, *10*, 1096.
28. Husson, O.; Husson, B.; Brunet, A.; Babre, D.; Alary, K.; Sarthou, J.-P.; Charpentier, H.; Durand, M.; Benada, J.; Henry, M. Practical improvements in soil redox potential (Eh) measurement for characterisation of soil properties. Application for comparison of conventional and conservation agriculture cropping systems. *Analytica chimica acta* **2016**, *906*, 98–109.
29. Ihrmark, K.; Bödeker, I.T.; Cruz-Martinez, K.; Friberg, H.; Kubartova, A.; Schenck, J.; Strid, Y.; Stenlid, J.; Brandström-Durling, M.; Clemmensen, K.E. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS microbiology ecology* **2012**, *82*, 666–677.
30. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, W.J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*; Academic Press, Inc.: New York, 1990.

31. Team, R.C. R: A language and environment for statistical computing. **2013**.
32. Barton, K. MuMIn: Multi-model inference. R package version 0.12. 2/r18. URL <http://R-Forge.R-project.org/projects/mumin> **2009**.
33. Elith, J.; H. Graham, C.; P. Anderson, R.; Dudík, M.; Ferrier, S.; Guisan, A.; J. Hijmans, R.; Huettmann, F.; R. Leathwick, J.; Lehmann, A. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* **2006**, 29, 129–151.
34. Hernandez, P.A.; Graham, C.H.; Master, L.L.; Albert, D.L. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* **2006**, 29, 773–785.

Supplementary materials

Table S1

Presence/absence data for *Amanita muscaria* and abiotic variables for the 240 sites included in the species distribution modeling

[The page contains extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document.]

Table S2

First 20 models from all possible combinations ranked by their AICc criteria

Models	(Intercept)	age	avg_ppt	clay_content	deposit	dom_tree	drainage	Ehph7	herb	humus	lichen	litter	moss	om	pH	shrub	silt_content	tree	df	loglik	AICc	delta	weight
27140	-6.16802967	-1.29688711	0.00668901	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.18390790	NA	0.97828905	-0.26433293	NA	NA	7	-111.669999	237.822677	0	0.001663745
27144	-5.19189044	-1.39438021	0.00491932	-0.10246858	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.65013593	NA	-0.19598041	NA	1.03137739	-0.24256279	NA	NA	8	-110.786688	238.1967529	0.174075648	0.001379930
27158	-2.08328916	-1.45551980	NA	-0.13855949	NA	*	NA	NA	NA	NA	-0.59681226	NA	-0.18161722	NA	0.87340292	-0.38705995	NA	NA	16	-101.967273	238.1740099	0.551332250	0.001262893
27142	-2.08922109	-1.59193351	NA	-0.15141440	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.75883016	NA	-0.23896454	NA	1.03002492	-0.2738474	NA	NA	7	-113.980544	238.4443874	0.621710127	0.001219326
25110	-2.42510582	-1.60642609	NA	-0.13212804	NA	*	NA	NA	NA	NA	-0.62547863	NA	NA	NA	0.86661217	-0.39506549	NA	NA	15	-103.161289	238.4054369	0.642759350	0.001206461
10760	-6.01815421	-1.27221644	0.00569139	-0.11349141	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.61239536	NA	-0.19496744	NA	0.93364168	NA	NA	NA	7	-112.042862	238.5684838	0.745806571	0.001145874
10756	-7.12060520	-1.15115310	0.00757614	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.51461129	NA	-0.18181036	NA	0.856215529	NA	NA	NA	6	-113.177622	238.715795	0.89380269	0.001064526
27396	-5.38279268	-1.37223501	0.00630160	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.04048237	-0.56988237	NA	-0.17862499	NA	0.90228474	-0.24536559	NA	NA	8	-111.168906	238.9611301	1.138512865	0.000941590
26642	-1.55960265	-1.36869423	NA	NA	NA	*	NA	NA	NA	NA	-0.19214385	NA	NA	NA	0.667201858	-0.42282618	NA	NA	14	-104.564391	238.9953850	1.172707716	0.000925635
10884	-6.32075069	-1.31847341	0.0067046703	NA	NA	NA	NA	NA	-0.13677097	NA	-0.53222639	NA	-0.21074281	NA	0.945547142	NA	NA	NA	7	-122.257238	239.9972358	1.174558502	0.000924772
27398	-1.40247781	-1.67407397	NA	-0.14777636	NA	NA	NA	NA	NA	-0.04985488	-0.75765404	NA	-0.22888977	NA	0.937652108	-0.24587477	NA	NA	8	-111.212641	239.0499045	1.227227616	0.000900736
31494	-2.16654757	-1.60584867	NA	-0.17973253	NA	NA	NA	NA	NA	-0.06508722	-0.75186604	NA	-0.27469210	0.02087829	1.085166832	-0.25174142	NA	NA	9	-110.148804	239.0802181	1.257540788	0.000887187
27154	-1.99434029	-1.39427167	NA	NA	NA	*	NA	NA	NA	NA	-0.46423844	NA	-0.17707735	NA	0.781472388	-0.44040172	NA	NA	15	-103.474344	239.0915268	1.268849508	0.000882185
25106	-2.31268487	-1.55319961	NA	NA	NA	*	NA	NA	NA	NA	-0.49893869	NA	NA	NA	0.775143915	-0.44938521	NA	NA	14	-104.622290	239.1112481	1.288570822	0.000873528
15016	-4.92748016	-1.38862998	0.00508513	-0.11469495	NA	NA	NA	NA	NA	-0.05006825	-0.62406110	NA	-0.18933661	NA	0.853719544	NA	NA	NA	8	-111.255328	239.1344423	1.311765050	0.000863456
27172	-5.69867451	-1.43599904	0.00696303	NA	NA	NA	-0.27869794	NA	NA	NA	-0.59043475	NA	-0.17097771	NA	0.943984312	-0.25977200	NA	NA	8	-111.271670	239.1667166	1.344039380	0.000849635
31240	-5.92496523	-1.3275351	0.00613855	-0.12180651	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.64402448	NA	-0.22873851	0.01495379	1.149516277	-0.25782927	NA	NA	9	-110.192402	239.1674132	1.344739575	0.000849339
59913	-5.73158215	-1.45402156	0.00507294	-0.17453461	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.61424377	NA	-0.20532402	NA	1.083124874	-0.24920294	0.012061283	NA	9	-103.201379	239.1833498	1.362775211	0.000841756
27202	-1.97251289	-1.53877898	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-8.00593004	NA	-0.65434031	NA	-0.22505630	NA	1.205406700	-0.25573988	NA	NA	7	-122.353587	239.1858761	1.363198841	0.000841534
28164	-6.77224375	-1.24716870	0.00684299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.5816922	0.051193104	-0.20613812	NA	1.048136095	-0.25897207	NA	NA	8	-111.309174	239.2417262	1.410948943	0.000823598

Table S3

First 20 models from all the possible combinations ranked by their BIC criteria

Models	(Intercept)	age	avg_ppt	clay_content	deposit	dom_tree	drainage	Ehph7	herb	humus	lichen	litter	moss	om	pH	shrub	silt_content	tree	df	loglik	BIC	delta	weight
10243	-1.34136720	NA	0.509000296	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.49329333	NA	0.490564779	NA	NA	NA	4	-116.061648	254.045836	0	0.000314258
8195	-1.76872304	NA	0.647070626	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.567994224	NA	NA	NA	3	-119.312677	255.0672641	1.021410532	0.002825201
8707	-1.32790211	NA	0.584311659	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.300028618	NA	NA	NA	0.624790458	NA	NA	NA	4	-117.219904	256.4503677	2.384514069	0.027811381
8196	-1.33114994	-0.474000894	0.575488534	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.523788254	NA	NA	NA	4	-117.248946	256.4504855	2.745949299	0.026853500
10755	-1.39024479	NA	0.469779380	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.424413022	NA	-0.450942681	NA	0.552671419	NA	NA	NA	5	-114.578900	256.5393754	2.513521748	0.025051476
2051	-1.27229888	NA	0.452252602	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.596390361	NA	NA	NA	NA	NA	3	-120.123484	256.6888859	2.643032277	0.024806675
10244	-1.38574167	-0.379595035	0.468677928	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.41210474	NA	0.467974577	NA	NA	NA	5	-114.883325	257.1698455	3.123991000	0.018461686
8708	-1.39566111	-0.498401243	0.506077828	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.522701811	NA	NA	NA	0.582854981	NA	NA	NA	5	-114.921344	257.2458839	3.200030267	0.017772985
26627	-1.34772762	NA	0.482360543	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.50594574	NA	0.537879380	-0.224223391	NA	NA	5	-115.244994	257.8911832	3.845429642	0.012871670
11267	-1.34451343	NA	0.514332479	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.242026569	-0.55291331	NA	NA	0.547639382	NA	NA	NA	5	-115.449131	258.3014578	4.255604236	0.010484432
10371	-1.35002558	NA	0.478745513	NA	NA	NA	NA	NA	-0.18692119	NA	NA	NA	-0.539719802	NA	0.533005168	NA	NA	NA	5	-115.550192	258.5035796	4.57726015	0.009476647
10499	-1.34801042	NA	0.491008132	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.48534370	NA	-0.451139063	NA	0.451139063	NA	NA	NA	5	-115.599268	258.6017317	4.555878069	0.009022799
14339	-1.33675395	NA	0.527112130	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.54043564	0.238829619	0.546874361	NA	0.656505043	NA	NA	NA	5	-115.610024	258.6231994	4.577458289	0.008924682
10305	-1.34240882	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.44081753	NA	NA	NA	NA	NA	0.51457214	NA	NA	NA	4	-118.395741	258.7140384	4.668184758	0.008530105
10247	-1.35529115	NA	0.456474607	-0.162124988	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.509608537	NA	NA	NA	5	-115.662102	258.7273999	4.681546276	0.008473303
10241	-1.29106118	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.68649213	NA	NA	NA	3	-121.202848	258.8476131	4.801759455	0.007979006
10275	-1.34865141	NA	0.521357068	NA	NA	NA	-0.12652884	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.471950809	NA	NA	NA	5	-115.816207	259.0356087	4.989755079	0.007263168
75779	-1.34265751	NA	0.532309257	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.50384547	NA	NA	0.106658302	5	-115.843683	259.0905612	5.044707621	0.007066319
2052	-1.32486222	-0.41672368	0.412318547	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0.521584251	NA	NA	NA	NA	NA	4	-118.645456	259.2134678	5.167614149	0.006645145
24579	-1.27629138	NA	0.62751719	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.617163498	-0.197095422	NA	NA	4	-118.645875	259.2143064	5.168452818	0.006423591

CHAPITRE IV

DNA DISTRIBUTION PATTERN AND METABOLITE PROFILE OF WILD EDIBLE LOBSTER MUSHROOM (*HYPOMYCES LACTIFLUORUM/RUSSULA BREVIPES*)

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui a été publié en anglais dans la revue *Génome* le 7 mars 2018. Il s'agit d'une revue utilisant un processus d'examen par les pairs. La référence de cet article est la suivante :

Laperriere G, Desgagné-Penix I, et Germain H. DNA distribution pattern and metabolite profile of wild edible lobster mushroom (*Hypomyces lactifluorum/Russula brevipes*). *Genome* **2019**, 61 (5), 329-336.

4.1 Contributions des auteurs

Genevieve Laperriere a effectué, en majorité, la conception de l'étude, l'échantillonnage terrain, la réalisation des expérimentations, l'analyse des données ainsi que l'écriture du manuscrit. Isabel Desgagné-Penix, par son expertise, a grandement contribué aux protocoles pour l'extraction des métabolites et l'utilisation du HPLC ainsi qu'aux analyses des résultats métabolomiques et à la révision du manuscrit. Hugo Germain est le directeur de recherche du laboratoire. Il a supervisé le projet, participé à l'échantillonnage terrain, contribué au design expérimental, a révisé et participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu les subventions pour l'étude.

4.2 Résumé de l'article (français)

Le champignon crabe (aussi appelé dermatose des russules) est un champignon sauvage comestible qui présente un potentiel commercial. Il résulte de l'infection, le plus communément, avec la russule à pied court (*Russula brevipes*) par un ascomycète *Hypomyces lactiflorum*. Dans cette étude, des tissus récoltés à plusieurs endroits dans le sporocarpie du champignon ont été échantillonnés à différents stades d'infection et ont été analysés par PCR quantitatif afin d'étudier la distribution de l'ADN de *R. brevipes* et *H. lactiflorum*. En parallèle, une analyse métabolomique a été réalisée pour détecter les différences dans le profil des métabolites entre le sporocarpie non-infecté de *R. brevipes* et le champignon crabe comestible. Les résultats ont démontré que l'ADN de *H. lactiflorum* n'est pas limité à la marge du sporocarpie, mais qu'il est réparti relativement uniformément dans le sporocarpie du champignon crabe. L'ADN de *R. brevipes* était également présent dans tout le sporocarpie, mais il était moins abondant aux marges et plus abondant au centre. L'abondance de l'ADN de *R. brevipes* diminuait aussi au fil de l'infection contrairement à *H. lactiflorum* qui restait abondant dans les stades plus avancés. L'analyse métabolomique a révélé que la chair du champignon crabe, laquelle demeure identique en apparence à celle de son hôte, subit une transformation qui altère son profil métabolique, notamment en matière de lipides et des composés terpéniques. Ces résultats décrivent une relation parasitique entre les deux espèces qui entraîne une diminution de l'ADN de *R. brevipes* et une modification de son profil métabolique.

4.3 Article complet (anglais) : DNA distribution pattern and metabolite profile of wild edible lobster mushroom (*Hypomyces lactifluorum*/*Russula brevipes*)

Abstract

Lobster mushroom is a wild edible mushroom with potential commercial value. It is the product resulting of the infection, most commonly of *Russula brevipes*, by *Hypomyces lactifluorum*. This study undertook quantitative polymerase chain reaction analysis of tissues sampled at different infection stages to investigate *R. brevipes* – *H. lactifluorum* interaction. We followed the colonization of *R. brevipes* sporocarps by *H. lactifluorum* that leads to the edible lobster mushrooms. In parallel, metabolomics analysis was performed to detect differences in metabolite profile among non-infected *R. brevipes* sporocarp and lobster mushroom. The results show that *H. lactifluorum* DNA is not restricted to the margin but is distributed relatively evenly across the sporocarp of the lobster mushroom. *Russula brevipes* DNA was also present throughout the sporocarp but was less abundant at the margins and increased inwards. *Russula brevipes* DNA also declined as the infection progressed. Metabolomics analysis revealed that the flesh of lobster mushroom, which remains identical in appearance to the flesh of the host, undergoes transformation that alters its metabolite profile, most notably of lipids and terpene compounds. These results define a parasitic relationship between the two species that entails a decline of *R. brevipes* DNA and a modification of its metabolite profile.

Introduction

Lobster mushroom is not a species but the result from an infection of sporocarps of *Russula* spp. (most commonly *Russula brevipes* Peck) by *Hypomyces lactifluorum* (Schwein.) Tul. & C. Tul., an ascomycete from the family *Hypocreaceae* in the order *Hypocreales* (Rogerson and Samuels 1994). This interaction is qualified as parasitism where *Russula* spp. is the host and *H. lactifluorum* is the parasite (Beug et al. 2014; Hanlin 1963; Rogerson and Samuels 1994). Its distribution is confined to North America (Rogerson and Samuels 1994). This limited distribution could be explained by the

similarly constrained spread of *R. brevipes* and ecological parameters, such as pH, extractable soil phosphorus, and stand opening, all of which are identified as important predictors of lobster mushroom's presence (Rochon et al. 2009). There is sparse information on the infection process, life cycle, and the colonization of the host species during the infection, such as how each of the two species is distributed throughout the sporocarp during the infection process. Hanlin (1963) suggested that *H. lactifluorum* infects very young *Russula* sporocarp, starting with infection of the gill surfaces, followed by rapid spread of the mycelia over the entire sporocarp. The growth of the host sporocarp continues but gradually transforms as a result of the influence of the parasite. Rogerson and Samuels (1994) reported that *H. lactifluorum* appeared in consecutive years in the same populations of species of *Lactarius* or *Russula*, indicating that infection may occur through *H. lactifluorum*-containing soil or that *H. lactifluorum* somehow grows in parallel with the host mycelium.

There are other similar situations in the genus *Hypomyces* where the host sporocarp appearance is changed following colonization by *Hypomyces* (Beug et al. 2014; McNeil 2006; Rogerson and Samuels 1994). *Hypomyces chrysospermus* Tul. & C. Tul. can colonize various boletes and covers the host sporocarp with a white layer followed by a powdery yellow layer. Similarly, the sporocarp of species of *Amanita* colonized by *Hypomyces hyalinus* (Schwein.) Tul. & C. Tul. develop a fluffy crust with a rough surface of various colors. *Hypomyces luteovirens* (Fr.) Tul. & C. Tul. on *Russula* spp. and *Hypomyces lateritius* (Fr.) Tul. & C. Tul. on *Lactaria* spp. are other similar cases. Among all these examples, none are considered edible or their edibility is unknown and gives to lobster mushroom a unique character. The lobster mushroom resulting from the infection is edible and is characterized by an orange to reddish color of the cap surface while the underlying flesh remains white. Its main morphological characteristics are the presence of shallow ridges at the underside of the cap (remnants of the gills of *Russula*), as well as irregularity of the sporocarp and stalk (Hanlin 1963). *Russula brevipes*, the most commonly reported host, has a bitter taste, but when associated with *H. lactifluorum*, to become lobster mushroom, is sought and appreciated

by mushroom pickers for its meaty texture, distinctive flavor, and good taste (McNeil 2006).

As knowledge about this mushroom is limited, more information about its formation and structure is necessary to strengthen its utilization and commercialization. Our objectives were to better understand the composition of the lobster mushroom sporocarp during the colonization of *R. brevipes* by *H. lactifluorum*. We also aimed to assess the metabolite composition profiles to try to understand the flavour changes between non-infected *R. brevipes* (white, bitter taste, non-edible) and lobster mushroom (orange, good taste, edible). To achieve the objectives, we used quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) technology to follow the presence of the two species inside the sporocarp of the lobster mushroom at different infection stages (partially colonized, completely colonized, and decaying sporocarp). Finally, to evaluate if there were any metabolite changes between the *R. brevipes* and lobster mushroom (infected *R. brevipes*), we used HPLC and UPLCqTOF-MS to assess the metabolite content.

Materials and methods

Mushroom collection and tissue sampling

Non-infected *R. brevipes* sporocarps were collected from Parc regional des Grèves (Quebec, Canada) and Gentilly (Quebec, Canada). Species were identified and confirmed by morphological features as well as Sanger sequencing of the entire ITS region (PCR conditions described hereafter). Infected sporocarps of three infected stages were collected from Zec Bostonnais (Quebec, Canada) and near Lake Sabourin (Quebec, Canada). The different infection stages included the following: (i) partially infected sporocarps of *R. brevipes* still having visible gills and white outer flesh, but showing visible reddening of the cap; (ii) completely infected sporocarps of *R. brevipes* also called lobster mushroom (sporocarp entirely red, no visible gills, a deformed cap, characteristic orange color, and firmer flesh than the *Russula*); and (iii) decaying sporocarps of lobster mushrooms characterized by the same characteristics as the

completely infected with softened red flesh, indicating that the mushroom has started to decay. Completely infected sporocarps of *R. brevipes* were cut into transversal crosssections and pieces of an average of 0.04 g were collected, with a new scalpel blade, from the internal portion of the sporocarp. Care was taken not to contaminate each section with tissue/DNA from neighboring sections. Seven pieces from each sporocarp were collected, and these pieces were numbered from the outermost part of the cap inward to the stalk (0 to 6). For the analyses of the proportion of *R. brevipes* and *H. lactifluorum* DNA in different infection stages of the lobster mushrooms sporocarp (non-infected *R. brevipes*, partially, completely, and decaying lobster mushroom), tissues were collected at the cap's edge (equivalent of position 0 from Figure 2), in the middle (equivalent of position 2 from Figure 2), and in the stalk (equivalent of position 4 or 5 from Figure 2).

DNA extraction

Fresh fungal tissue was placed in 200 µl AP1 buffer and pulverized by a hand drill mounted with a blue pestle until a homogenous solution was obtained. Fungal DNA was extracted with DNeasy plant kit (Qiagen, Montreal, Canada), according to the manufacturer's instructions. DNA samples were kept frozen at -20 °C until analysis. *Russula brevipes* DNA was obtained from sporocarps of non-infected *R. brevipes*. For *H. lactifluorum*, DNA was extracted from completely infected sporocarps of *R. brevipes* and isolated by cloning.

PCR amplification and sequencing

We amplified the whole ITS region for *R. brevipes* and *H. lactifluorum* for alignment and specific primers generation (to be used for qPCR analysis). Universal fungal primers ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Gardes and Bruns 1993; White et al. 1990) were used. Sequences were compared with those available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). PCR was performed

with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Whitby, Canada), according to the manufacturer's instructions under the following conditions: 34 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C. Reactions were preceded by a 30 s denaturation step at 98 °C and terminated with a 5 min elongation step at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel with 1× TAE (Tris-Acetate-EDTA), stained with SYBR® Safe DNA Gel (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Canada), and visualized under UV light (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad, Saint-Laurent, Canada). PCR products were purified by QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and sent to the Québec Genome Innovation Centre of McGill University (Montreal, Quebec, Canada) for Sanger sequencing. Species identities were confirmed using the BLASTn algorithm from the NCBI nucleotide database and BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org>).

Cloning of *H. lactifluorum* ITS

ITS PCR products were cloned with pBluescript II KS (+) vector. The vector was digested with the restriction enzyme EcoRV (New England Biolabs), and the amplified fragment was inserted by blunt-end ligation with T4 DNA ligase (New England Biolabs), according to the manufacturer's instructions. Ligation reactions were transformed in electro-competent *Escherichia coli* DH10B cells, and positive colonies containing recombinant plasmids were identified by blue/white selection on LB agar plates containing ampicillin 50 µg/mL, X-gal 40 µg/mL, and IPTG 0.2 mM. The plasmids were purified with QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen), and amplified fragment integration was confirmed by double digestion with the restriction enzymes EcoRI and XhoI (New England Biolabs).

Design and specificity testing of primers

Hypomyces lactifluorum and *R. brevipes* sequences, obtained by sequencing the ITS region of genomic DNA, and sequences available on NCBI were aligned with CLC MainWorkbench software 7.6.4 (Qiagen) to identify variable regions for primer

design. For qPCR, specific primers targeting smaller amplicons were designed for *H. lactifluorum* (H.L-1, ATTACCGAGTCTCCGAACTCCCAA and H.L-2, GATTCGTTTCGCTTGCCCTTTTCG) and for *R. brevipes* (R.B-1, CATCCTCAACCTGCTTCGTTCTATCG and R.B-2, CGAGCGAAACCCAAGACGTAGAAAC) with a combination of softwares, including Primer3 v. 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) and CLC MainWorkbench v. 7.6.4 (Qiagen). The BLASTn algorithm available on NCBI was used to assess the in silico specificity of these primers. PCR amplification with novel specific primers was carried out with Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), according to the manufacturer's standard instructions under the following conditions: 34 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 56 °C, and 35 s at 68 °C. Reactions were preceded by a 30 s denaturation step at 95 °C and terminated by a 5 min elongation step at 68 °C. PCR products were visualized as described previously.

qPCR

qPCR assays were performed in 96-well hard-shell PCR plates with the CFX Connect Real-Time system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Each 20 µl reaction mixture consisted of 10 µl of 2x SsoAdvanced universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 0.5 µM of each primer, and 8 µl of target DNA diluted 1/100. Each tissue sample underwent two technical replications with three biological replicates for each different infected stage. A negative control sample was included in each assay. The reference gene was the 5.8S ribosomal RNA encoding gene amplified with primers 5.8S-F, CTTTCAACAACGGATCTCTTGGYTC and 5.8S-R, GCAAKGTGCGTTCAAAGATTTCG, which were designed to amplify both species. Prior to the experiments, thermal gradient and dilution curves (1, 1/10, 1/100, 1/1000, and 1/10 000) were generated for each primer pair with pooled DNA samples to determine optimal annealing temperature and reaction efficiency. qPCR products from a few samples for each primer pair were visualized on agarose gel to confirm amplicon size and the absence of nonspecific amplification and primer dimers. Amplicon purity was confirmed by melting curve analysis. The optimized thermal cycle protocol

included 3 min incubation at 98 °C followed by 39 cycles of 15 s at 98 °C, 40 s at 60 °C or 56.2 °C for *H. lactifluorum* and *R. brevipes*, respectively, and 40 s at 72 °C, followed by melting curves from 65 to 95 °C with 0.5 °C increments. Fluorescence threshold level was determined with the default adaptive baseline algorithm of CFX Manager Software 3.1.1517.0823. Relative quantitation assessed the relative amount of *H. lactifluorum* DNA versus *R. brevipes* DNA at each position in the sporocarp. Normalized expression was calculated by the Livak method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak and Schmittgen 2001). In all cases, the lowest normalized expression served as calibrator, and error propagation was used to calculate standard deviation (Hellemans et al. 2007).

Metabolites analysis

Lobster mushrooms (completely infected) and non-infected *R. brevipes* sporocarp were used for HPLC-DAD (high performance liquid chromatography-diode array detector) analysis. Each mushroom sample (1 g) was ground in 10 mL of 80% methanol and agitated for 24 h at room temperature. Extracts were filtered through Whatman paper No. 4. The filtered methanol/water solution was extracted twice with 10 ml of 100% hexane. The aqueous phase was collected and evaporated at room temperature under a chemical hood. After evaporation, metabolites were re-suspended in 0.1 ml of 20% methanol. The extracts were analysed with a Prominence-I liquid chromatograph HPLC (Shimadzu, Md., USA). Separation was achieved in an analytical reverse phase C₁₈ column (Kinetex 5 m× 150mm× 4.6 mm, Phenomenex, Calif., USA) at 30 °C. The mobile phases were constituted of (A) 2.5% acetic acid in water and (B) 100% acetonitrile. A total of 20 µl of extract was injected and separated by the gradient method: 100% A for 5 min, 98% A and 2% B for 2 min, 80% A and 20% B for 2 min, 60% A and 40% B for 15 min, 40% A and 60% B for 10 min, 20% A and 80% B for 10 min, 2% A and 98% B for 6 min, and, finally, 98% A and 2% B for 4 min at a flow rate of 0.5 ml/min. DAD in full scan mode detected absorption at wavelengths between 190 and 800 nm. To better understand the metabolites composition and their identity, one sample of completely infected and non-infected *R. brevipes* were analyzed using UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometry).

The UPLC-MS analysis was performed using a Waters Acquity Ultra-Performance LC system (Waters), equipped with a binary pump system (Waters). An Acquity Ethylene Bridged Hybrid (BEH) C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm id x, 1.7 mm particle size) from Waters was used. The molecules were separated with a mobile phase that consisted of 0.2% acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B), and the flow-rate was 0.2 ml/min. The initial elution gradient was 2% B for 0–1 min, 2%–100% B for 1–30 min, isocratic 100% B for 30–33 min, 100%–2% B for 33–33.5 min, and isocratic 2% B for 33–40 min. The MS analyses were carried out on a QTOF Micro mass spectrometer (Waters) equipped with a Z-spray electrospray interface. The analysis was performed in both positive and negative mode and the data were acquired through a masses scan from 100 to 1250 m/z without collision. The ionization source parameters were as follows: source temperature 120 °C, cone gas flow rate 50 l/h, desolvation gas flow rate 350 l/h, and desolvation temperature 200 °C. Nitrogen (99% purity) was used as a nebulizing gas. Data acquisition was carried out with the MassLynx 4.1 software. Masses extraction, deconvolution, isotopes, and library search were performed using MZMine 2 (Pluskal et al. 2010).

Results

Hypomyces lactifluorum and *R. brevipes* primers produce specific amplicons

Both primer pairs amplified genomic DNA extracted from a lobster mushroom (completely infected sporocarps of *R. brevipes*), which should contain both DNAs (Figure 1, lanes 2 and 6). PCR products generated with specific primers for *H. lactifluorum* (H.L-1 and H.L-2) and *R. brevipes* (R.B-1 and R.B-2) were detected at expected sizes, 207 bp for *H. lactifluorum* (Figure 4.1, lanes 1 and 2) and 164 bp for *R. brevipes* (Figure 1, lanes 6 and 7). No amplifications were detected with *H. lactifluorum* primers for *R. brevipes* genomic DNA (Figure 4.1, lane 3) and with *R. brevipes* primers combined with plasmid containing the *H. lactifluorum* ITS fragment (Figure 1, lane 5). We conclude that the primers designed yielded specific amplicons suitable for qPCR experimentation.

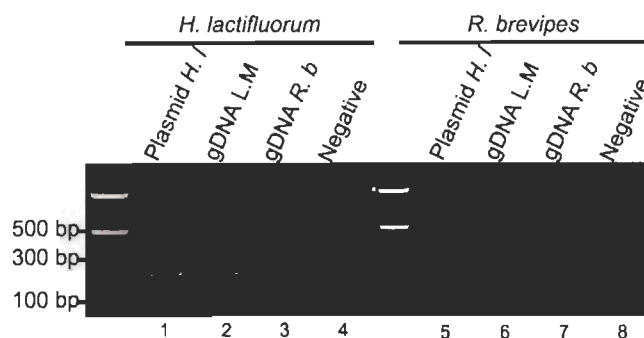


Figure 1 PCR amplification products obtained with specific primers for *Hypomyces lactifluorum* (H.L-1, H.L-2) and *Russula brevipes* (R.B-1, R.B-2). Plasmid H.l corresponds to plasmid DNA containing *H. lactifluorum* ITS fragment; gDNA L.M corresponds to genomic DNA extracted from lobster mushroom; gDNA R.b corresponds to genomic DNA extracted from a non-infected *R. brevipes* sporocarp; Negative corresponds to the negative control.

Colonization of R. brevipes by H. lactifluorum in lobster mushroom sporocarp

To assess the composition of the lobster mushroom sporocarp and to investigate the colonization of *R. brevipes* by *H. lactifluorum*, we conducted qPCR amplification. Melt curve was done for each reaction and in all cases only one dissociation curve was present. Samples were placed on a gel to visualize size and specificity of amplicons (see Figure S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). DNA from *H. lactifluorum* was detected throughout the sporocarp (Figure 2B). Same results were obtained with other sporocarp (see Figures S2A and S2C in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). Interestingly, DNA from *R. brevipes* was less abundant at the cap's edge (positions 0 and 6) than towards the interior of the sporocarp (positions 3–5) (Figure 2C). Its levels varied between the sporocarp tested, but it was always less abundant at the margin (see Figures S2B and S2D in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>).

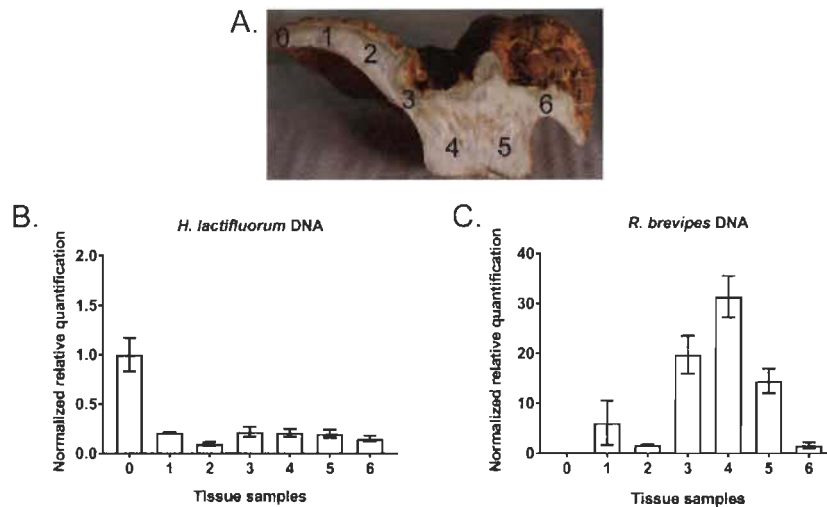


Figure 2 qPCR results of *Hypomyces lactifluorum* and *Russula brevipes* DNA inside sporocarp of lobster mushroom. (A) Sporocarp transversal cross-section and localization of sampled tissues. (B–C) qPCR results of (B) *H. lactifluorum* DNA and (C) *R. brevipes* DNA inside lobster mushroom. Samples 0–6 indicate sampled tissue localization.

Proportion of H. lactifluorum and R. brevipes in different infection stages of the lobster mushroom sporocarp

A melt curve was performed and samples were placed on a gel as previously described. With *R. brevipes* primers, no non-specific bands were detected (see Figure S3A in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). However, when using *H. lactifluorum* primers, minor non-specific bands were detected in some of the stages, but *H. lactifluorum* specific band was always present (see Figure S3B in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). However, these likely appeared very late in the PCR as they do not appear to affect quantitation; as seen in Figure 3B, *H. lactifluorum* is undetected in *R. brevipes* compared to infected mushroom. *Hypomyces lactifluorum* DNA was found to be increasingly present as the infection progressed (Figure 3B). *Russula brevipes* DNA was also present in all stages, but it was only detected at a very low level in decaying lobster mushroom sporocarp (Figure 3C). Taken together, the data suggest that, as infection progresses, the *R. brevipes* DNA declines in the sporocarp concurrently with the increasing *H. lactifluorum* DNA amount. Same results were obtained with other

biological replicates with both primer pairs (see Figure S4 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>).

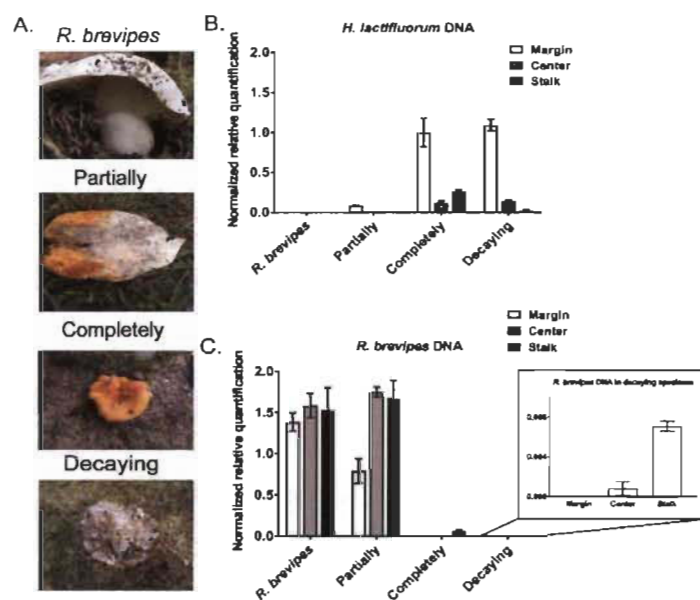


Figure 3 qPCR results of *Hypomyces lactifluorum* and *Russula brevipes* DNA at different infection stages and in non-infected *R. brevipes*. (A) Pictures of different infected sporocarps: non-infected *R. brevipes*, partially infected, completely infected (mature lobster mushroom), and decaying lobster mushroom sporocarp. (B–C) qPCR results of (B) *H. lactifluorum* DNA and (C) *R. brevipes* DNA in a series of samples at different infection stages. Tissues were collected at the cap's edge (Margin, equivalent of position 0 from Figure 2), in the middle (Center, equivalent of position 2 from Figure 2), and in the stalk (Stalk, equivalent of position 4 or 5 from Figure 2).

Metabolites analysis of R. brevipes and lobster mushroom sporocarps

Although orange coloration of the lobster mushroom sporocarp (exterior) is much different from the white exterior of sporocarps of *R. brevipes*, the color and appearance of their interior flesh is identical. Various metabolites may be responsible for the differences in phenotype, taste, and edibility of the two mushrooms. The HPLC results were identical for all sporocarps and only one representative chromatogram is shown. A striking difference between chromatograms at 254 nm was seen between 32 and 38 min for extracts of *R. brevipes* (Figure 4A) versus those of lobster mushroom

(Figure 4B). Three-dimensional absorption plots, which allowed easier visualization of peaks throughout the light spectrum, showed similar striking differences including the presence of a peak between 30 and 35 min at 450 nm in lobster mushroom (Figures 4C and 4D). These results clearly demonstrate that *H. lactifluorum* alters the metabolite profile (composition and level) of *R. brevipes* flesh and contains metabolites absent from *R. brevipes*. UPLC-qTOF-MS detected a total of 183 masses in positive and negative mode, 38 of which were specific to the lobster mushroom and 78 were specific to *R. brevipes* (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). To simplify the output of the mass spectrometry data, we grouped the metabolites into large families: lipids, alkaloids, terpenoids, phenolics, amino acids, and others. The most striking difference between the general composition is the large diversity of terpenoids present in uninfected sporocarps of *R. brevipes* that are completely absent from the infected *R. brevipes* sporocarps (Figures 5A and 5C). Conversely, the lobster mushroom contained a much larger diversity of lipid compounds (Figure 5B) and amount of lipids (Figure 4.5D) when compared with *R. brevipes* (Figure 5C). Table S1 (Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>) lists the details of all the metabolites found in lobster mushroom and *R. brevipes*.

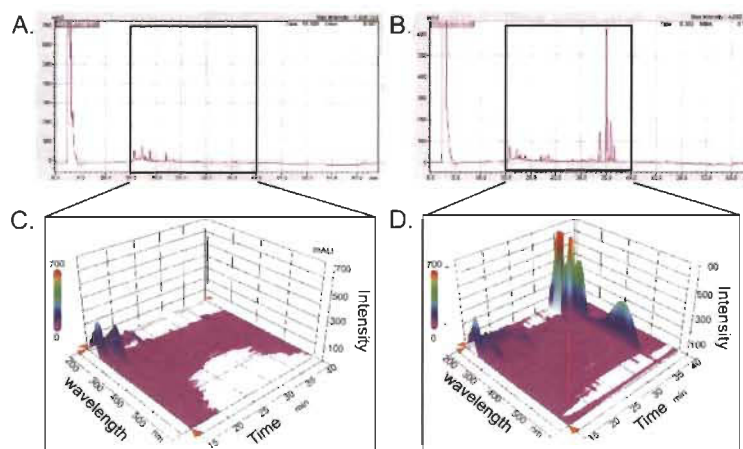


Figure 4 HPLC chromatogram of extracts from non-infected *Russula brevipes* and lobster mushroom sporocarps. (A–B) HPLC chromatograms at 254 nm of (A) non-infected *R. brevipes* and (B) lobster mushroom extracts. (C–D) Three-dimensional HPLC plots showing the 15–40 min range of (C) *R. brevipes* and (D) lobster mushroom.

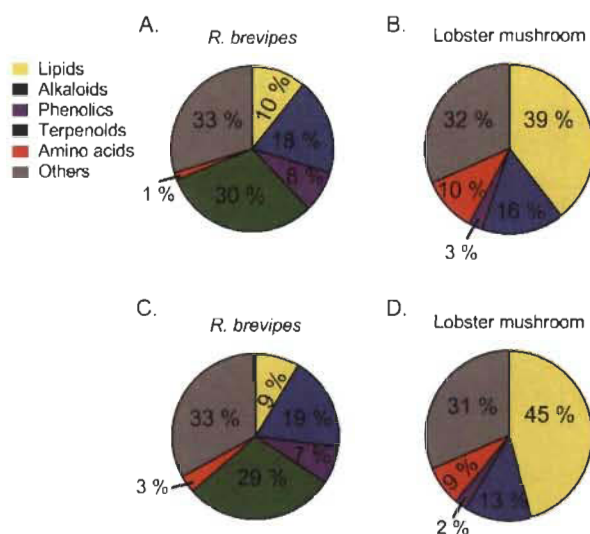


Figure 5 Pie chart indicating some compound groups detected by UPLC-qTOF-MS analysis. Percentage of diversity of the selected families of compounds for (A) non-infected *Russula brevipes* and (B) lobster mushroom and the relative amount of each compound group calculated with the total area under the curve for (C) non-infected *R. brevipes* and (D) lobster mushroom.

Discussion

The complex biology of lobster mushroom is far from being fully understood, and the *R. brevipes* and *H. lactifluorum* species distribution throughout the sporocarp and during the course of the infection process has not been examined previously. Results of our qPCR analysis show that *H. lactifluorum* and *R. brevipes* DNA are present in every infection stage analyzed and are distributed throughout the sporocarp. However, as the mushroom ages, the proportion of *R. brevipes* DNA relative to *H. lactifluorum* DNA decreases sharply, suggesting that *R. brevipes* is being degraded. We also show that the metabolite profile of *R. brevipes* is modified by the presence of *H. lactifluorum*. In this study, we designed specific primer pairs and confirmed their specificity for amplifying *H. lactifluorum* and *R. brevipes* ITS regions (Figure 1). Our results showed that *H. lactifluorum* DNA is distributed throughout the sporocarp and is not limited to the margin, as hinted by the orange color present only at the sporocarp surface, in fact the parasite penetrates the sporocarp (Figure 2B). As for *R. brevipes*, its DNA is also present throughout the whole sporocarp. It is, however, less abundant at the edge than in the

middle of the cap (Figure 2C). Hanlin (1963) observed infection of the gills on very young carpophore and he suggested that the *H. lactifluorum* mycelium, after infecting the gills, spreads to the entire cap surface. The surface of the *R. brevipes* sporocarp gets completely covered by a thick orange layer, as a result of skyrin production originating from the parasite (Helfer 1991; Poldmaa 2011). However, neither our results nor Hanlin can demonstrate whether the infection process is initiated from the outside of the sporocarp or if the *H. lactifluorum* mycelium is also present inside when the red color appears at the surface.

Russula brevipes DNA was present in all infected stages, but only at a very low level in completely infected sporocarp and decaying lobster mushroom (Figure 3C). Moreover, its presence in completely infected sporocarp reached its maximum level in the stipe although we see from Figure 3 that the amount of *R. brevipes* DNA is very low at this stage, relative to that of *H. lactifluorum* DNA (Figure 3C). *Russula brevipes* DNA appeared to be degrading during the evolution of the infection, and it was not the case for *H. lactifluorum* DNA, which was still abundant (Figure 3B). Our findings support parasitism between the two species, as proposed by other authors (Beug et al. 2014; Hanlin 1963; Rogerson and Samuels 1994). A parasitic system is an ecological relationship where the parasite benefits from its host either by feeding, hiding, or breeding at its expense (Zelmer 1998). Parasitic fungi utilize nutrients from the host and have an entirely win–lose relationship (Petersen 2012). The decline of *R. brevipes* DNA could be explained by the fact that traffic of the major nutriment is essentially one way from host to parasite (Lewis 1973). *Hypomyces lactifluorum* could steal available nutrients from *R. brevipes* and then expand through the sporocarp. Lacking proper nutrition, *R. brevipes* would deteriorate and die. We cannot rule out the possibility that *H. lactifluorum* could secrete a toxin or an enzyme to kill or digest *R. brevipes* to sustain its own growth.

Difference in metabolite contents between R. brevipes and lobster mushroom

We wanted to investigate a potential explanation for the gustative difference between *R. brevipes*, which does not have a good taste, and lobster mushroom, which presents a very distinct flavor really appreciated by consumers. Major change between non-infected *R. brevipes* sporocarp and lobster mushrooms is the difference of diversity and amount of fatty acid compounds (Figure 5). Fatty acids were detected in much higher proportion in lobster mushrooms than non-infected *R. brevipes* (Figure 5). Analyses of fatty acid composition revealed that several edible mushrooms showed a wide diversity of fatty acids (Pedneault et al. 2006; Ribeiro et al. 2009). Some of these species, such as *Russula cyanoxantha* (Schaeff.) Fr., *Suillus granulatus* (L.) Roussel, and *Amanita caesarea* (Scop.) Pers., are appreciated for their good taste (McNeil 2006). In most of the cases, mushrooms showed a higher amount of unsaturated fatty acid versus saturated fatty acids (Dimitrijevic et al. 2018; León-Guzmán et al. 1997; Pedneault et al. 2006; Ribeiro et al. 2009). It was also the case for lobster mushroom (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). However, unsaturated fatty acid could be precursors of flavor compounds, and it was reported in tomato plant that a change in the level of fatty acid could change its flavor profile and consequently its taste (Wang et al. 1996). Free amino acid was another compound more abundant in the lobster mushrooms than non-infected *R. brevipes*, and some compounds such as monosodium glutamate-like (MSG-like) components and 5' nucleotides were only detected in lobster mushroom (Figure 5; Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). Aspartic and glutamic acids were described as monosodium glutamate-like (MSG-like) components (Yamaguchi 1979). These components are found to be taste-active and give flavor to mushrooms (Chen 1986). They are associated to the umami and palatable taste (Yamaguchi 1979). MSG-like components are found in high proportion in some wild edible mushroom species, for example, *Amanita rubescens* Pers., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., and *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (León-Guzmán et al. 1997; Yang et al. 2001). MSG-like components and 5' nucleotides have a synergistic effect on flavour and increase the umami taste (Yamaguchi et al. 1971). Aspartic acid (M+H

146,0574) and pseudouridine (M+H 243,0846) detected in lobster mushrooms could play a role in its tasty flavor (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). In addition, *R. brevipes* showed a higher abundance of terpene and phenolic compounds (Figure 5A), while terpenes were not detected in the lobster mushroom (Figure 5B). These secondary metabolites are more specific to plant, bacteria, and fungi and are produced, in part, for protection and defense (Hopkins 2003). *Russula brevipes* could produce a high diversity of these metabolites as a protectant against insects or fungivores. A group of sesquiterpenes were isolated in mushrooms of the family *Russulaceae*, and some of these molecules had a pungent taste for humans (Magnusson et al. 1972, 1973). A bioassay using a natural fungivore, the opossum *Didelphis virginiana*, identified five species of mushroom members of the family *Russulaceae*, previously reported as having a taste pungent to humans, which were not eaten and rejected by the opossum (Camazine et al. 1983). These mushrooms may contain similar sesquiterpenoids as those identified in *R. brevipes* (Mizuno 1995). Indeed, several sesquiterpenoid compounds were specifically detected in *R. brevipes* including lactarorufin (M+H 265.1672) and turmerone (M+H 265.1672), which may contribute to unliked aroma and taste (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). Terpenoid compounds were not detected in the lobster mushroom (Figures 5B and 5D). Given that several terpenoid compounds are known to have a pungent and bitter taste, it is tempting to speculate that the absence of terpenoids in the lobster mushroom is a factor that makes it more palatable than *R. brevipes* (Figures 5A and 5B). A striking difference between Figures 5A and 5B is the “disappearance” of the terpenoid compounds, in particular sesquiterpene (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>), that seem to be converted into lipids when the *R. brevipes* is being infected. In fact, it is highly unlikely that sesquiterpenes or any terpenoids would be converted to fatty acids. To our knowledge no known enzyme can catalyze the direct conversion of sesquiterpenes or terpenoids into fatty acids. However, *H. lactifluorum* may have the capacity to catabolize terpenoids into simpler carbene-based molecules from which they could build

lipids. A common element in the terpene and fatty acid biosynthesis pathway is acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) (Hopkins 2003). When *R. brevipes* is uninfected, acetyl-CoA is used largely for the production of terpenes and more precisely sesquiterpenes (see Table S1 in Supplementary Materials available online at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/gen-2017-0168>). When *H. lactifluorum* infects sporocarp of *R. brevipes*, the same enzyme could be used to the benefit of the fatty acid metabolic pathway.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study using PCR technologies to analyse the relationship between *H. lactifluorum* and *R. brevipes* and that investigated the causes of the taste differences between the two mushrooms. The main findings described is that at the stage that lobster mushroom is eaten it contains only traces amount of *R. brevipes* in its sporocarp. However, our metabolite analyses demonstrated that the metabolite profile specific to *R. brevipes* has been completely altered and that several molecules of the terpenoid family, that may be responsible for the bad taste of *R. brevipes*, have disappeared and that fatty acids are very abundant in the lobster mushroom.

Acknowledgements

We thank the Berthouix Laboratory for providing pBlueScript vector, Melodie B. Plourde for technical support and critical manuscript review, and Aparna Singh for her expertise with HPLC. For funding we are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for a Discovery grant to H.G. and the Université du Québec à Trois-Rivières for the research chair to H.G. Finally, we are indebted to Marcel Otis for providing pictures of *R. brevipes* and for his help as forest guide.

References

- Beug, M., Bessette, A.E., and Bessette, A.R. 2014. Ascomycete fungi of North America: a mushroom reference guide. University of Texas Press.
- Camazine, S.M., Resch, J.F., Eisner, T., and Meinwald, J. 1983. Mushroom chemical defense. *J. Chem. Ecol.* **9**(10): 1439–1447. doi:10.1007/BF00990749. PMID: 24408731.
- Chen, H. 1986. Studies on the characteristics of taste-active components in mushroom concentrate and its powderization. Master's thesis, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Dimitrijevic, M.V., Mitic, V.D., Jovanovic, O.P., Stankov Jovanovic, V.P., Nikolic, J.S., Petrovic, G.M., and Stojanovic, G.S. 2018. Comparative study of fatty acids profile in eleven wild mushrooms of *Boletacea* and *Russulaceae* families. *Chem. Biodivers.* **15**(1): e1700434. doi:10.1002/cbdv.201700434. PMID: 29164790.
- Gardes, M., and Bruns, T.D. 1993. Its primers with enhanced specificity for Basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**(2): 113–118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x. PMID:8180733.
- Hanlin, R.T. 1963. Morphology of *Hypomyces lactifluorum*. *Bot. Gaz.* **124**(6): 395–404. doi:10.1086/336225.
- Helfer, W. 1991. Pilze auf Pilzfruchtkörpern. Untersuchungen zur Ökologie, Systematikund Chemie. *Libri Bot.* **1**: 1–157.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**(2): R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19. PMID:17291332.
- Hopkins, W.G. 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., and López, M.G. 1997. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *J. Agric. Food Chem.* **45**(11): 4329–4332. doi:10.1021/jf970640u.
- Lewis, D. 1973. Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.* **48**(2): 261–277. doi:10.1111/j.1469-185X.1973.tb00982.x.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**(4): 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262. PMID:11846609.

- Magnusson, G., Thorén, S., and Wickberg, B. 1972. Fungal extractives I. Structure of a sesquiterpene dialdehyde from *Lactarius* by computer simulation of the NMR spectrum. *Tetrahedron Lett.* **13**(12): 1105–1108. doi:10.1016/S0040-4039(01)84520-2.
- Magnusson, G., Thorén, S., and Drakenberg, T. 1973. Fungal extractives—IV: Structure of a novel sesquiterpene dialdehyde from *Lactarius* by spectroscopic methods. *Tetrahedron*, **29**(11): 1621–1624. doi:10.1016/S0040-4020(01)83407-4.
- McNeil, R. 2006. *Le grand livre des champignons du Québec et de l'Est du Canada*. Éditions M. Quintin.
- Mizuno, T. 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev. Int.* **11**(1): 5–21. doi:10.1080/87559129509541017.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., and Tweddell, R.J. 2006. Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family *Boletaceae*. *Mycol. Res.* **110**(10): 1179–1183. doi:10.1016/j.mycres.2006.05.006. PMID:16959482.
- Petersen, H.J. 2012. *The kingdom of Fungi*. Princeton University Press, Denmark.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., and Oresic, M. 2010. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinform.* **11**: 395. doi: 10.1186/1471-2105-11-395.
- Poldmaa, K. 2011. Tropical species of *Cladobotryum* and *Hypomyces* producing red pigments. *Stud. Mycol.* **68**: 1–34. doi:10.3114/sim.2011.68.01. PMID:21523187.
- Ribeiro, B., de Pinho, P.G., Andrade, P.B., Baptista, P., and Valentão, P. 2009. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: a comparative study. *Microchem. J.* **93**(1): 29–35. doi:10.1016/j.microc.2009.04.005.
- Rochon, C., Pare, D., Khasa, D.P., and Fortin, J.A. 2009. Ecology and management of the lobster mushroom in an eastern Canadian jack pine stand. *Can. J. For. Res.* **39**(11): 2080–2091. doi:10.1139/X09-118.
- Rogerson, C.T., and Samuels, G.J. 1994. Agaricolous species of *Hypomyces*. *Mycologia*, **86**(6): 839–866. doi:10.2307/3760597.
- Wang, C., Chin, C.-K., Ho, C.-T., Hwang, C.-F., Polashock, J.J., and Martin, C.E. 1996. Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavor compounds by expressing the yeast Δ -9 desaturase gene in tomato. *J. Agric. Food Chem.* **44**(10): 3399–3402. doi:10.1021/jf960174t.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, W.J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc., New York. pp. 315–322.

- Yamaguchi, S. 1979. The umami taste. ACS Publications.
- Yamaguchi, S., Yoshikawa, T., Ikeda, S., and Ninomiya, T. 1971. Measurement of the relative taste intensity of some l-amino acids and 5'-nucleotides. *J. Food Sci.* **36**(6): 846–849. doi:10.1111/j.1365-2621.1971.tb15541.x.
- Yang, J.-H., Lin, H.-C., and Mau, J.-L. 2001. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chem.* **72**(4): 465–471. doi:10.1016/S0308-8146(00)00262-4.
- Zelmer, D.A. 1998. An evolutionary definition of parasitism. *Int. J. Parasitol.* **28**(3): 531–533. doi:10.1016/S0020-7519(97)00199-9. PMID:9559372.

CHAPITRE V

DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 La biodiversité via le métabarcoding

Plusieurs études valident que les données obtenues par métabarcoding versus des approches standards sont similaires au niveau des indices de diversité (alpha, bêta), mais qu'au niveau taxonomique l'information est plus complète, rapide à produire et moins dépendante d'une expertise taxonomique parfois difficile à trouver (Ji, Ashton et al. 2013, Shaw, Clarke et al. 2016, Valentini, Taberlet et al. 2016). En comparant le métabarcoding avec des méthodes traditionnelles, des études ont démontré que l'utilisation de l'ADN augmente les probabilités de détection des espèces ainsi que la quantité d'espèces différentes détectées (Valentini, Taberlet et al. 2016, Nakagawa, Yamamoto et al. 2018). Avec l'utilisation de plusieurs réplicats, les mêmes espèces peuvent être détectées avec l'ADN versus les méthodes traditionnelles tout cela en moins de temps et en diminuant les coûts reliés au matériel, aux déplacements et aux personnels (Shaw, Clarke et al. 2016). Pour les champignons, l'échantillonnage visuel apporte beaucoup de biais notamment par la production éphémère des sporocarpes, leur variabilité inter-annuelle, leur dépendance face aux conditions environnementales et par la difficulté de voir ou d'identifier les sporocarpes pour grand nombre de champignons.

Malgré l'énorme quantité d'informations moléculaires obtenues dans cette étude de la diversité fongique, le métabarcoding a toutefois des limitations. Les limitations vont se trouver dans plusieurs étapes du processus de génération des données. Durant les PCR, des erreurs de nucléotides peuvent être introduites dans les séquences, des contaminants (organismes non ciblés) peuvent être amplifiés et des séquences chimériques (chimères) peuvent être produites (Taberlet, Coissac et al. 2012). La présence d'erreurs, de contaminants et de chimères peut surestimer la richesse en

organisme et engendrer des problèmes de résolution taxonomique (Tedersoo, Bahram et al. 2014). Le choix des amorces est aussi une étape cruciale. Même si des amorces sont dites universelles, elles peuvent ne pas amplifier certains groupes et si elles ne sont pas assez spécifiques, elles vont amplifier des organismes non ciblés (Stielow, Lévesque et al. 2015). La présence d'inhibiteurs dans les réactions PCR (acide humique, entre autres) et l'abondance en ADN de certains organismes peut aussi limiter ou empêcher l'amplification de l'ADN et spécialement chez des organismes plus rares (moins abondants) (Schrader, Schielke et al. 2012, Ray, Althammer et al. 2016). Outre les limitations des étapes précédentes (extraction, PCR, séquençage), de nombreuses séquences peuvent être rejetées pour cause de mauvaises qualités durant le traitement bio-informatique et malgré l'évolution constante des différents pipelines et logiciels pour le traitement des données, la bio-informatique reste un défi de taille (Coissac, Riaz et al. 2012).

Dans le cas des champignons, les sporocarpes (partie qui propage les spores) sont éphémères, leur production est dépendante des conditions météorologiques et la plupart ne sont pas visibles à l'œil. L'utilisation des méthodes moléculaires que ce soit pour cibler une espèce comme le barcoding ou à large échelle pour estimer une diversité dans le cas du métabarcoding sont des outils efficaces qui peuvent permettre de répondre à beaucoup de questions sur la fonge globale. Dans les travaux de recherche de ce premier objectif de cette thèse, une estimation de la diversité fongique a été réalisée par métabarcoding. Cela a permis de faire une caractérisation globale de la diversité fongique à travers une partie de la forêt boréale et tempérée du Québec et d'identifier des variables abiotiques modulatrices de la richesse et de la composition fongique. Nous avons été plus loin qu'un simple inventaire typique d'observation terrain où généralement, seuls les champignons produisant un sporocarpe visible à l'œil sont détectés. Au total, 14 503 OTUs qui ont été générés dont 4 544 ont obtenu une assignation taxonomique pour le règne fongique. Ceci correspond à 31 % des OTUs qui ont obtenu une assignation taxonomique. Parmi ces OTUs, 50 % ont été assignés au genre et 33 % à l'espèce. Ce faible taux d'assignation est retrouvé dans d'autres études similaires où environ 60 % des OTUs générés sont restés sans assignation (Schmidt,

Balint et al. 2013, Tedersoo, Bahram et al. 2014, Nagati, Roy et al. 2018, Day, Dunfield et al. 2019). Ceci s'explique par la précision et de la quantité d'informations que contiennent les bases de références moléculaires publiques ou privées (Taberlet, Coissac et al. 2012). Nombreux organismes ne possèdent pas de références moléculaires permettant d'attribuer leur séquence à une assignation taxonomique. La majorité des espèces fongiques demeurent inconnues pour plusieurs raisons : certaines espèces fongiques ne sont pas facilement identifiables, d'autres sont difficiles, voire impossibles à faire croître *in vitro*, l'espèce n'est représentée que par un seul spécimen et il peut aussi s'agir du premier spécimen découvert (Seifert 2009, Xu 2016). Il faudra alors attendre que les bases de données contiennent plus d'informations afin d'obtenir des assignations d'OTUs plus élevés. Toutefois, l'utilisation de plusieurs bases de données moléculaires peut permettre d'augmenter le succès d'assignation taxonomique sur un plus grand nombre de séquences ou d'OTUs (Macher, Macher et al. 2017). De plus, l'usage de plusieurs codes-barres permet aussi d'augmenter le nombre et la précision des assignations. Chez certains groupes de champignons, la région ITS n'est pas assez variable. C'est le cas pour plusieurs champignons pathogènes chez les humains et les animaux dont l'utilisation du gène qui code pour le facteur translation-élongation EF-1 α , comme code-barres génétique obtient de meilleures résolutions (Meyer, Irinyi et al. 2018).

Cette caractérisation plus précise et complète de la diversité fongique pour plusieurs types de peuplements permettait aussi d'étudier les effets et les relations que les variables abiotiques peuvent avoir sur certain aspect de la diversité soit la richesse et la composition fongique. Des résultats qui ne pouvaient pas être mis en évidence avec des inventaires fongiques incomplets. Les variables abiotiques identifiées comme de forts prédicteurs de la richesse fongique ou modulatrices de la composition fongique expliquent malheureusement peu de la variation totale, mais cela s'observe en écologie ou de larges biomes sont étudiés et que les relations peuvent être complexes (Tedersoo, Bahram et al. 2014).

Malgré toutes ces limites, nous avons obtenu des résultats prometteurs sur la structure des communautés fongiques à travers la forêt boréale et tempérée et comment elle est façonnée par les variables abiotiques de la région. Afin de gérer et conserver la biodiversité, il faut connaître le portrait et détecter d'éventuels changements afin de trouver des solutions efficaces. Dans une perspective d'utiliser à son plein potentiel les données générées, les données de fréquence obtenues par métabarcoding ont été utilisées dans le deuxième objectif pour l'élaboration des modèles de répartition des espèces fongiques d'intérêts et pour la cartographie des sites potentiels de récolte.

5.2 Modèles de répartition des espèces

Dans le deuxième objectif de cette thèse, l'occurrence des espèces fongiques obtenue par métabarcoding a été utilisée comme donnée de fréquence dans l'élaboration des modèles de répartition des espèces (SDM). Des modèles mathématiques basés sur des données de fréquence d'une espèce et sur les caractéristiques environnementales permettent de générer des formules mathématiques afin de prédire la distribution d'une espèce ciblée (Franklin 2010). Les données de métabarcoding ont permis d'obtenir des données de fréquence sur beaucoup d'espèces, bien plus que par un simple échantillonnage visuel (Laperriere et al 2019 résultats non publiés). Dans cette étude, les modèles de distribution ont été générés par des méthodes modernes de régression linéaire : les modèles linéaires généralisés (GLMs). Les GLMs sont des outils plus flexibles pour analyser des relations écologiques qui sont souvent complexes (Austin 1987). Plusieurs études encouragent l'utilisation des modèles modernes de régression linéaire pour la modélisation de la distribution des espèces incluant les plantes (Guisan, Edwards Jr et al. 2002), les animaux (Zimmermann et Breitenmoser 2002), les oiseaux (Manel, Dias et al. 1999) et même les champignons (Wollan, Bakkestuen et al. 2008). Afin de répondre au deuxième objectif de cette thèse, nous avons généré des modèles de probabilité de présence au moyen de l'utilisation de modèles linéaires généralisés (GLMs) pour générer une formule mathématique prédisant la probabilité d'occurrence pour une espèce ciblée et l'appliquer sur des données écoforestières afin de générer des cartes facilement utilisables pour la communauté mycologique. Un des modèles générés

pour *Amanita muscaria* permettait d'expliquer 17 % de la variance totale laissant ainsi 83 % de la variance n'étant pas expliquée par nos variables prédictives (Table 1 – Chapitre III). L'utilisation des modèles GLM pour prédire la distribution des espèces a des limites à prendre en compte. La capacité prédictive peut souvent être basse surtout avec des données écologiques dont les relations sont complexes et avec des occurrences faibles (Roloff et Kernohan 1999, Guisan et Zimmermann 2000). Le modèle peut aussi avoir peu de succès prédictif lorsqu'appliqué ailleurs que dans la région échantillonnée, ce qui fait que le modèle est souvent adapté en fonction des régions (Power 1993, Guisan et Theurillat 2000).

Dans notre cas, la faible fréquence de plusieurs espèces fongiques d'intérêts a empêché la génération de modèles de qualité (AICc) avec une absence d'évidence statistique que les variables prédictives étaient liées à la présence de l'espèce. Ce qui n'a pas été le cas pour *A. muscaria*, une espèce toxique fréquemment retrouvée dans les forêts mixtes du Québec et donc nous avons obtenu une occurrence dans 60 des 240 sites utilisés dans le modèle. Une des raisons expliquant la faible détection de certaines espèces d'intérêts, qui pour la plupart sont des basidiomycètes, serait l'utilisation d'amorce universelle ciblant tous les champignons et limitant l'amplification et la détection d'espèces plus rares ou moins abondantes. En général, les ascomycètes représentent la plus grande proportion recensée dans les études de métabarcoding, tandis que les basidiomycètes qui comprennent beaucoup d'espèces fongiques d'intérêts sont plus faiblement représentés (Tedersoo, Bahram et al. 2014, Li, Wang et al. 2016, Nagati, Roy et al. 2018). Les ascomycètes étant trop abondants, pourraient limiter la détection d'autres groupes fongiques. L'utilisation d'une amorce plus spécifique aux basidiomycètes pourrait permettre d'augmenter leur détection (Gardes et Bruns 1993). Malheureusement dans le cadre de cette étude les amorces, à ce jour connues pour augmenter la spécificité face aux basidiomycètes, donnent des amplicons trop longs pour l'utilisation en séquençage Illumina Miseq.

Nos modèles de probabilité de distribution sont basés sur des données d'occurrence, c'est-à-dire de présence/absence, à partir de séquençage d'ADN extrait

d'échantillons de sol. Nous avons donc obtenu des probabilités de présence du mycélium et non pas des probabilités de production de sporocarpes. Le manque de validation terrain des modèles de probabilité des espèces est un sérieux problème en écologie. Les cartes permettront de localiser les sites potentiels de présence des espèces ciblées. Elles permettront d'éliminer les sites qui représentent une faible probabilité de présence de l'espèce ciblée et de concentrer les efforts de cueillette vers les sites où la probabilité de présence est plus élevée. Ainsi des validations sur le terrain devront être faites sur nos modèles afin d'appuyer leur fiabilité, mais aussi de trouver des sites qui pourront servir à d'éventuelle étude pour prédire la production des sporocarpes : l'élément du champignon qui est recherché par les cueilleurs. D'autres variables prédictives pourraient aussi être éventuellement incluses dans les modèles pour combler la variance inexpliquée telles que des données de compétitions ou de co-occurrences entre les espèces (Dormann, Bobrowski et al. 2018).

5.3 Conclusions

La caractérisation globale de la diversité fongique a permis d'alimenter les bases moléculaires pour les champignons de la forêt boréale et tempérée du Québec, mais aussi de contribuer à la littérature scientifique dans le domaine de la mycologie. Cette thèse a aussi fourni des pistes pertinentes à explorer sur les variables abiotiques qui influencent et modulent la richesse et la composition fongique. Le couvert en mousse et l'âge du peuplement se sont avérés être des prédicteurs de la richesse fongique pour les écosystèmes forestiers boréaux et tempérés, des références qui pourront être prises en compte lors de l'élaboration de stratégies de conservation de la diversité fongique. La structure de la communauté fongique à travers la région a été mise en évidence et il a été démontré que la communauté est caractérisée par un fort taux de remplacement des espèces. De plus, le pH du sol, les précipitations moyennes et l'âge du peuplement ont été identifiés comme des modulateurs de la composition fongique. Un premier pas dans l'étude des communautés fongiques de nos forêts. Dans une perspective plus large, d'autres biomes devraient être caractérisés au niveau de la diversité fongique où l'on risquerait d'obtenir des patrons de communautés différents

(dans les régions plus au sud). Cela permettrait d'obtenir des portraits globaux et peut-être identifier d'autres variables abiotiques ayant un effet à l'échelle de la province.

L'élaboration de modèles de prédiction de présence des espèces fongiques est un grand pas vers le développement d'une industrie des champignons forestiers plus solide. Les cueilleurs sont à la base de la chaîne de commercialisation et il importe de fournir des outils de localisation des sites potentiels de récolte des espèces d'intérêts. À partir des occurrences obtenues par métabarcoding, qui couvrent un large éventail de groupes fongiques, cela permet de faire des inventaires sans la nécessité de voir les sporocarpes et permet de sauver temps et argent. De cette façon, on peut obtenir des modèles de distribution des espèces pouvant être appliqués sur des bases de données écoforestières. Dans le deuxième objectif de cette thèse, *Amanita muscaria* a été utilisée en exemple et son modèle a été appliqué sur des bases de données écoforestières permettant de créer une carte de localisation montrant la probabilité de présence de l'espèce sur une grande région. Les régions en rouge pourront alors être ciblées pour des validations terrain et pour de futurs sites afin de permettre de récolter des données sur la production des sporocarpes.

En dernier lieu, le dernier chapitre de cette thèse était une étude permettant de mieux comprendre la biologie d'un champignon comestible recherché dans le marché québécois, le champignon crabe. Les résultats ont permis de confirmer la relation de parasitisme entre *Russula brevipes* et *Hypomyces lactifluorum*, par le moyen de résultats qui ont démontré une diminution de l'ADN de *R. brevipes* dans le sporocarpe pour complètement disparaître dans les stades plus avancés du champignon. De plus, un changement dans la composition des métabolites de *R. brevipes* a été observé. Une abondance de terpènes chez *R. brevipes* était absente chez le champignon crabe qui lui était plus abondant en lipides. Des indices permettant d'expliquer le changement de saveur chez la russule lorsqu'elle est complètement parasitée. C'est d'ailleurs la première étude qui a caractérisé le profil des métabolites du champignon crabe et ce seront de nouvelles références disponibles dans la littérature mycologique.

En conclusion générale, cette thèse a permis de développer les connaissances sur la diversité fongique globale du Québec et de combler un manque d'informations sur les inventaires fongiques en fournissant des données d'inventaires complets. Ces données sont cruciales pour des compagnies comme Progigraph qui travaillent avec les ressources naturelles afin de développer et de commercialiser ces ressources auprès des régions éloignées et des communautés autochtones. Les nombreux résultats obtenus permettront aussi d'augmenter les références et la recherche scientifique dans le domaine de la mycologie en fournissant des indices sur les relations entre les champignons et leur environnement, mais aussi sur leur biologie. L'élaboration de cartes de probabilité de présence des espèces fongiques d'intérêts est un premier pas pour la mise en place d'une industrie solide pour les champignons forestiers d'intérêts.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amaranthus, M. P., D. Pilz, A. Moore, R. Abbott and D. Luoma (2000). American matsutake (*Tricholoma magnivelare*) across spatial and temporal scales. Council Conference on Forest Soils Biology and Forest Management.
- Austin, M. (1987). Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Theory and models in vegetation science*, Springer: 35-45.
- Badotti, F., F. S. de Oliveira, C. F. Garcia, A. B. M. Vaz, P. L. C. Fonseca, L. A. Nahum, G. Oliveira and A. Góes-Neto (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC microbiology* **17**(1): 42.
- Baldrian, P. (2008). Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. British mycological society symposia series, Elsevier.
- Baldrian, P. (2017). Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS microbiology reviews* **41**(2): 109-130.
- Bell, A. (1983). Dung fungi: an illustrated guide to coprophilous fungi in New Zealand, Victoria University Press.
- Bergius, N. and E. Danell (2000). The Swedish matsutake (*Tricholoma nauseosum* syn. *T. matsutake*): distribution, abundance and ecology. *Scandinavian Journal of Forest Research* **15**(3): 318-325.
- Beug, M., A. E. Bessette and A. R. Bessette (2014). Ascomycete fungi of North America: a mushroom reference guide, University of Texas Press.
- Biopterre (2009). Analyse de commercialisation des champignons forestiers sauvages à potentiel commercial du Québec. La Pocatière: 78.
- Blaalid, R., S. Kumar, R. H. Nilsson, K. Abarenkov, P. M. Kirk and H. Kauserud (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources* **13**(2): 218-224.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany* **98**(3): 426-438.
- Boa, E. (2006). Champignons comestibles sauvages: vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations. Rome (Italie), Food & Agriculture Org.

- Boeraeve, M., O. Honnay and H. Jacquemyn (2018). Effects of host species, environmental filtering and forest age on community assembly of ectomycorrhizal fungi in fragmented forests. *Fungal ecology* **36**: 89-98.
- Bray, J. R. and E. Gorham (1964). Litter production in forests of the world. *Advances in ecological research*, Elsevier. **2**: 101-157.
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine learning* **45**(1): 5-32.
- Brown, G. D., D. W. Denning, N. A. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea and T. C. White (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine* **4**(165): 165rv113-165rv113.
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**(3): 473-495.
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture, Australian Centre for International Agricultural Research Canberra.
- Burke, D. J., M. N. Weintraub, C. R. Hewins and S. Kalisz (2011). Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry* **43**(4): 795-803.
- Chalot, M. and A. Brun (1998). Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS microbiology reviews* **22**(1): 21-44.
- Cheeke, T. E., R. P. Phillips, E. R. Brzostek, A. Rosling, J. D. Bever and P. Fransson (2017). Dominant mycorrhizal association of trees alters carbon and nutrient cycling by selecting for microbial groups with distinct enzyme function. *New Phytologist* **214**(1): 432-442.
- Coissac, E., T. Riaz and N. Puillandre (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular ecology* **21**(8): 1834-1847.
- Cooke, R. C. and A. D. Rayner (1984). Ecology of saprotrophic fungi, Longman.
- Courty, P.-E., M. Buée, A. G. Diedhiou, P. Frey-Klett, F. Le Tacon, F. Rineau, M.-P. Turpault, S. Uroz and J. Garbaye (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(5): 679-698.
- Cromack Jr, K. and B. Caldwell (1992). The role of fungi in litter decomposition and nutrient cycling. *Mycology series (USA)*.
- Cummins, G. B. and Y. Hiratsuka (2003). Illustrated genera of rust fungi, American Phytopathological Society (APS Press).

- Day, N. J., K. E. Dunfield, J. F. Johnstone, M. C. Mack, M. R. Turetsky, X. J. Walker, A. L. White and J. L. Baltzer (2019). Wildfire severity reduces richness and alters composition of soil fungal communities in boreal forests of western Canada. *Global Change Biology*.
- De Miguel, A. M., B. Águeda, S. Sánchez and J. Parladé (2014). Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza* **24**(1): 5-18.
- Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann and J. Ellis (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**(4): 414-430.
- Delgado-Baquerizo, M., F. T. Maestre, P. B. Reich, T. C. Jeffries, J. J. Gaitan, D. Encinar, M. Berdugo, C. D. Campbell and B. K. Singh (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature communications* **7**: 10541.
- Deslandes, J., P. C. (2001). Mise en valeur alimentaire et médicinale des plantes et champignons de sous-bois de la forêt feuillue de l'Outaouais, Institut d'aménagement de la forêt feuillue: 58.
- Després, J. (2012). L'univers des champignons, Les Presses de l'Université de Montréal.
- Dobranic, J. K. and J. C. Zak (1999). A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia* **91**(5): 756-765.
- Dormann, C. F., M. Bobrowski, D. M. Dehling, D. J. Harris, F. Hartig, H. Lischke, M. D. Moretti, J. Pagel, S. Pinkert and M. Schleuning (2018). Biotic interactions in species distribution modelling: 10 questions to guide interpretation and avoid false conclusions. *Global ecology and biogeography* **27**(9): 1004-1016.
- Dunham, S. M., T. E. O'dell and R. Molina (2003). Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadiensis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological research* **107**(10): 1163-1177.
- Fahner, N. A., S. Shokralla, D. J. Baird and M. Hajibabaei (2016). Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: recovery, resolution, and annotation of four DNA markers. *PLoS One* **11**(6): e0157505.
- Fallu, J. (2004). Évaluation du potentiel de récolte des champignons forestiers comestibles dans les boisés de l'Estrie, Québec.
- Feeney, M. J., J. Dwyer, C. M. Hasler-Lewis, J. A. Milner, M. Noakes, S. Rowe, M. Wach, R. B. Beelman, J. Caldwell and M. T. Cantorna (2014). Mushrooms and health summit proceedings. *The Journal of nutrition* **144**(7): 1128S-1136S.

- Fortin, J. A., Y. Piché and U. L. C. d. r. e. b. forestière (2000). Les champignons forestiers: récolte, commercialisation et conservation de la ressource, Sainte-Foy [Québec]: Centre de recherche en biologie forestière, Université
- Fortin, J. A., C. Plenchette and Y. Piché (2016). Les mycorhizes: l'essor de la nouvelle révolution verte, Quae.
- Franklin, J. (2010). Mapping species distributions: spatial inference and prediction, Cambridge University Press.
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(1): 6-29.
- Gardes, M. and T. D. Bruns (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* **2**(2): 113-118.
- Gévry, M.-F. (2010). Étude des facteurs environnementaux déterminant la répartition de champignons forestiers comestibles en Gaspésie, Québec, Université du Québec à Rimouski.
- Gévry, M.-F. (2011). Évaluation du potentiel de cueillette de champignons forestiers comestibles au Lac-Saint-Jean.
- Gilbertson, R. L. and L. Ryvarden (1987). North American Polypores Vol. 2. Megasporoporia-Wrightoporia. *North American Polypores Vol. 2. Megasporoporia-Wrightoporia.*: 437-885.
- Giustarini, D., R. Rossi, A. Milzani, R. Colombo and I. Dalle-Donne (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *Journal of cellular and molecular medicine* **8**(2): 201-212.
- Gründemann, D., S. Harlfinger, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, R. Berkels, N. Jung, A. Rubbert and E. Schömig (2005). Discovery of the ergothioneine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(14): 5256-5261.
- Guisan, A., T. C. Edwards Jr and T. Hastie (2002). Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: setting the scene. *Ecological modelling* **157**(2-3): 89-100.
- Guisan, A. and J.-P. Theurillat (2000). Equilibrium modeling of alpine plant distribution: how far can we go? *Phytocoenologia* **30**(3/4): 353-384.
- Guisan, A. and N. E. Zimmermann (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological modelling* **135**(2-3): 147-186.

- Hajibabaei, M., G. A. Singer, P. D. Hebert and D. A. Hickey (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet* **23**(4): 167-172.
- Hanlin, T. R. (1963). Morphology of *Hypomyces lactifluorum*. *Botanical Gazette* **124**(6): 395-404.
- Hättenschwiler, S., A. V. Tiunov and S. Scheu (2005). Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **36**: 191-218.
- Hawksworth, D. L. and R. Luecking (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum* **5**(4).
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. DeWaard (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**(1512): 313-321.
- Heilmann-Clausen, J., E. Aude and M. Christensen (2005). Cryptogam communities on decaying deciduous wood—does tree species diversity matter? *Biodiversity & Conservation* **14**(9): 2061-2078.
- Hemkemeyer, M., B. T. Christensen, C. C. Tebbe and M. Hartmann (2019). Taxon-specific fungal preference for distinct soil particle size fractions. *European Journal of Soil Biology* **94**: 103103.
- Hobbie, E. A., N. S. Weber and J. M. Trappe (2001). Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* **150**(3): 601-610.
- Hofrichter, M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology* **30**(4): 454-466.
- Hollingsworth, P. M., L. L. Forrest, J. L. Spouge, M. Hajibabaei, S. Ratnasingham, M. van der Bank, M. W. Chase, R. S. Cowan and D. L. Erickson (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(31): 12794-12797.
- Ihrmark, K., I. T. Bödeker, K. Cruz-Martinez, H. Friberg, A. Kubartova, J. Schenck, Y. Strid, J. Stenlid, M. Brandström-Durling and K. E. Clemmensen (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS microbiology ecology* **82**(3): 666-677.
- Ji, Y., L. Ashton, S. M. Pedley, D. P. Edwards, Y. Tang, A. Nakamura, R. Kitching, P. M. Dolman, P. Woodcock and F. A. Edwards (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters* **16**(10): 1245-1257.
- Johnson, N. C., J. Graham and F. Smith (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist* **135**(4): 575-585.

- Jung, S. C., A. Martinez-Medina, J. A. Lopez-Raez and M. J. Pozo (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology* **38**(6): 651-664.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry* **113**(1): 9-16.
- Kalaras, M. D., J. P. Richie, A. Calcagnotto and R. B. Beelman (2017). Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food chemistry* **233**: 429-433.
- Kasischke, E. S. (2000). Boreal ecosystems in the global carbon cycle. *Fire, climate change, and carbon cycling in the boreal forest*, Springer: 19-30.
- Kausrud, H., C. Mathiesen and M. Ohlson (2008). High diversity of fungi associated with living parts of boreal forest bryophytes. *Botany* **86**(11): 1326-1333.
- Knapp, D. G., G. M. Kovács, E. Zajta, J. Groenewald and P. W. Crous (2015). Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **35**: 87.
- Langlois, A., R. Archambault, R. Lebeuf, J.-P. Turgon, R. McNeil and J. Brisson (2013). Inventaire des macromycètes d'une forêt ancienne de la région du Haut-Saint-Laurent. *Le Naturaliste Canadian* **137**(2): 62-77.
- Lebonah, D., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi and J. Pramoda Kumari (2014). DNA barcoding on bacteria: A Review. *Advances in Biology* **2014**.
- Leonardi, M., F. Paolocci, A. Rubini, G. Simonini and G. Pacioni (2005). Assessment of inter-and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. *FEMS Microbiology Letters* **243**(2): 411-416.
- Li, J., M. Delgado-Baquerizo, J.-T. Wang, H.-W. Hu, Z.-J. Cai, Y.-N. Zhu and B. K. Singh (2019). Fungal richness contributes to multifunctionality in boreal forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*: 107526.
- Li, W., M. M. Wang, X. G. Wang, X. L. Cheng, J. J. Guo, X. M. Bian and L. Cai (2016). Fungal communities in sediments of subtropical Chinese seas as estimated by DNA metabarcoding. *Scientific reports* **6**.
- Liu, Q., H. Ma, Y. Zhang and C. Dong (2018). Artificial cultivation of true morels: current state, issues and perspectives. *Critical reviews in biotechnology* **38**(2): 259-271.
- Manel, S., J.-M. Dias and S. J. Ormerod (1999). Comparing discriminant analysis, neural networks and logistic regression for predicting species distributions: a case study with a Himalayan river bird. *Ecological modelling* **120**(2-3): 337-347.

- McNeil, R. (2006). Le grand livre des champignons du Québec et de l'Est du Canada, Éditions M. Quintin.
- Nagati, M., M. Roy, S. Manzi, F. Richard, A. Desrochers, M. Gardes and Y. Bergeron (2018). Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal forest. *Plant and Soil* **432**(1-2): 345-357.
- Nakagawa, H., S. Yamamoto, Y. Sato, T. Sado, T. Minamoto and M. Miya (2018). Comparing local-and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater biology* **63**(6): 569-580.
- Natel, P. and P. Neumann (1992). Ecology of ectomycorrhizal-basidiomycete communities on a local vegetation gradient. *Ecology* **73**(1): 99-117.
- Nguyen, N. H., Z. Song, S. T. Bates, S. Branco, L. Tedersoo, J. Menke, J. S. Schilling and P. G. Kennedy (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241-248.
- O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo and R. Vilgalys (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 5544-5550.
- Pan, Y., R. A. Birdsey, J. Fang, R. Houghton, P. E. Kauppi, W. A. Kurz, O. L. Phillips, A. Shvidenko, S. L. Lewis and J. G. Canadell (2011). A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science* **333**(6045): 988-993.
- Paul, B. and S. Snyder (2010). The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell death and differentiation* **17**(7): 1134.
- Petersen, H. J. (2012). The kingdom of Fungi. Denmark, Princeton University Press.
- Phillips, R. P., E. Brzostek and M. G. Midgley (2013). The mycorrhizal-associated nutrient economy: a new framework for predicting carbon–nutrient couplings in temperate forests. *New Phytologist* **199**(1): 41-51.
- Phillips, S. J., R. P. Anderson and R. E. Schapire (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling* **190**(3-4): 231-259.
- Pilz, D. and R. Molina (2002). Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* **155**(1-3): 3-16.
- Plourde, P. (2016). Valorisation des champignons forestiers nordiques par l'étude de leur activité biologique pour des applications pharmaceutiques et cosméceutiques, Université du Québec à Chicoutimi.

- Podani, J. and D. Schmera (2011). A new conceptual and methodological framework for exploring and explaining pattern in presence-absence data. *Oikos* **120**(11): 1625-1638.
- Power, M. (1993). The predictive validation of ecological and environmental models. *Ecological modelling* **68**(1-2): 33-50.
- Priyadharsini, P. and T. Muthukumar (2016). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and potassium-solubilizing microorganisms on agricultural productivity. *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*, Springer: 111-125.
- Ray, J. L., J. Althammer, K. S. Skaar, P. Simonelli, A. Larsen, D. Stoecker, A. Sazhin, U. Z. Ijaz, C. Quince and J. C. Nejstgaard (2016). Metabarcoding and metabolome analyses of copepod grazing reveal feeding preference and linkage to metabolite classes in dynamic microbial plankton communities. *Molecular ecology* **25**(21): 5585-5602.
- Read, D. and J. Perez-Moreno (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* **157**(3): 475-492.
- Rochon, C., D. Pare, D. P. Khasa and J. A. Fortin (2009). Ecology and management of the lobster mushroom in an eastern Canadian jack pine stand. *Canadian Journal of Forest Research* **39**(11): 2080-2091.
- Rogerson, C. T. and G. J. Samuels (1994). Agaricolous Species of *Hypomyces*. *Mycologia* **86**(6): 839-866.
- Roloff, G. J. and B. J. Kernohan (1999). Evaluating reliability of habitat suitability index models. *Wildlife Society Bulletin*: 973-985.
- Rosling, A., F. Cox, K. Cruz-Martinez, K. Ihrmark, G.-A. Grelet, B. D. Lindahl, A. Menkis and T. Y. James (2011). Archaeorhizomycetes: unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi. *Science* **333**(6044): 876-879.
- Rosling, A., M. G. Midgley, T. Cheeke, H. Urbina, P. Fransson and R. P. Phillips (2016). Phosphorus cycling in deciduous forest soil differs between stands dominated by ecto- and arbuscular mycorrhizal trees. *New Phytologist* **209**(3): 1184-1195.
- Rożek, K., K. Rola, J. Błaszowski and S. Zubek (2019). Associations of root-inhabiting fungi with herbaceous plant species of temperate forests in relation to soil chemical properties. *Science of the Total Environment* **649**: 1573-1579.
- Ruokolainen, A., E. Shorohova, R. Penttilä, V. Kotkova and H. Kushnevskaia (2018). A continuum of dead wood with various habitat elements maintains the diversity of wood-inhabiting fungi in an old-growth boreal forest. *European journal of forest research* **137**(5): 707-718.

- Saikkonen, K., S. H. Faeth, M. Helander and T. Sullivan (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual review of Ecology and Systematics* **29**(1): 319-343.
- Santalalahti, M. (2018). Fungal Communities in Boreal Forest Soils: The Effect of Disturbances, Seasons and Soil Horizons. *Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentariae, Biologicae. Universitatis Helsinkiensis*.
- Schmidt, P. A., M. Balint, B. Greshake, C. Bandow, J. Rombke and I. Schmitt (2013). Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology & Biochemistry* **65**: 128-132.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque and W. Chen (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(16): 6241-6246.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology* **113**(5): 1014-1026.
- Shaw, J. L., L. J. Clarke, S. D. Wedderburn, T. C. Barnes, L. S. Weyrich and A. Cooper (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation* **197**: 131-138.
- Smith, S. E. and D. J. Read (2010). Mycorrhizal symbiosis, Academic press.
- Smith, S. E. and F. A. Smith (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* **62**: 227-250.
- Steffen, K. T., A. Hatakka and M. Hofrichter (2002). Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3442-3448.
- Stielow, J. B., C. A. Lévesque, K. A. Seifert, W. Meyer, L. Irinyi, D. Smits, . . . V. Robert (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia-Molecular phylogeny and evolution of fungi* **35**: 242-263.
- Stone, J. K., C. W. Bacon and J. F. White Jr (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial endophytes*, CRC Press: 17-44.
- Štursová, M., L. Žifčáková, M. B. Leigh, R. Burgess and P. Baldrian (2012). Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS microbiology ecology* **80**(3): 735-746.

- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann and E. Willerslev (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol* **21**(8): 2045-2050.
- Tanret, C. (1909). Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, l'ergothioneine. *Rend. Acad. Sci.* **149**: 222-224.
- Tedersoo, L., M. Bahram, T. Cajthaml, S. Põlme, I. Hiiesalu, S. Anslan, H. Harend, F. Buegger, K. Pritsch and J. Koricheva (2016). Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *The ISME journal* **10**(2): 346.
- Tedersoo, L., M. Bahram, S. Põlme, U. Kõljalg, N. S. Yorou, R. Wijesundera, L. V. Ruiz, A. M. Vasco-Palacios, P. Q. Thu and A. Suija (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *science* **346**(6213): 1256688.
- Tedersoo, L. and M. E. Smith (2013). Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal biology reviews* **27**(3-4): 83-99.
- Torres, M. L. (2017). A Presence-Only Species Distribution Model Comparison Predicting the Distribution of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*), Murray State University.
- Trappe, M. (2004). Habitat and host associations of *Craterellus tubaeformis* in northwestern Oregon. *Mycologia* **96**(3): 498-509.
- Valášková, V., J. Šnajdr, B. Bittner, T. Cajthaml, V. Merhautová, M. Hofrichter and P. Baldrian (2007). Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology and Biochemistry* **39**(10): 2651-2660.
- Valentini, A., P. Taberlet, C. Miaud, R. Civade, J. Herder, P. F. Thomsen, . . . T. Dejean (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol* **25**(4): 929-942.
- Van der Heijden, M. G., T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders (1998). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* **79**(6): 2082-2091.
- Van Der Heijden, M. G., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**(6706): 69.
- Van Der Heijden, M. G., F. M. Martin, M. A. Selosse and I. R. Sanders (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**(4): 1406-1423.

- Verzeaux, J., B. Hirel, F. Dubois, P. J. Lea and T. Tétu (2017). Agricultural practices to improve nitrogen use efficiency through the use of arbuscular mycorrhizae: basic and agronomic aspects. *Plant Science* **264**: 48-56.
- Villeneuve, N., M. M. Grandtner and J. A. Fortin (1989). Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic macrofungi in the Laurentide Mountains of Quebec. *Canadian journal of botany* **67**(9): 2616-2629.
- Wagg, C., S. F. Bender, F. Widmer and M. G. van der Heijden (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(14): 5266-5270.
- Wani, B. A., R. Bodha and A. Wani (2010). Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* **4**(24): 2598-2604.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. Van Der Putten and D. H. Wall (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**(5677): 1629-1633.
- Wollan, A. K., V. Bakkestuen, H. Kauserud, G. Gulden and R. Halvorsen (2008). Modelling and predicting fungal distribution patterns using herbarium data. *Journal of Biogeography* **35**(12): 2298-2310.
- Xu, X., P. E. Thornton and W. M. Post (2013). A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography* **22**(6): 737-749.
- Yuan, H.-S., Y.-L. Wei and X.-G. Wang (2015). Maxent modeling for predicting the potential distribution of Sanghuang, an important group of medicinal fungi in China. *Fungal Ecology* **17**: 140-145.
- Zimmermann, F. and U. Breitenmoser (2002). A distribution model for the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the Jura Mountains, Switzerland. *Predicting species occurrences: issues of accuracy and scale*: 653-659.